



Bisphénol A

Effets sur la reproduction

Rapport préliminaire

2 juin 2010

Groupe d'experts

Carlo ADAMO, ENSCP Chimie ParisTech, Paris

Jean-Philippe ANTIGNAC, Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA), USC INRA 2013, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (ONIRIS), Nantes

Jacques AUGER, Laboratoire de biologie de la reproduction, CECOS, Hôpital Cochin, Université Paris V, Paris

Patrick BALAGUER, Equipe Signalisation hormonale, environnement et cancer, Inserm U 896, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, Montpellier

Deborah BOURC'HIS, Unité de génétique et biologie du développement CNRS UMR 3215-Inserm U 934 Pôle de Biologie du Développement et Cancer, Paris

Louis BUJAN, Groupe de recherche en fertilité humaine, Equipe d'accueil 3694, CECOS, Hôpital Paule de Viguière, CHU Toulouse

Cécile CHEVRIER, Groupe d'étude de la reproduction chez l'homme et les mammifères, Inserm U 625, Université Rennes 1

Corinne COTINOT, Laboratoire de biologie du développement et reproduction INRA, UMR 1198, ENVA, CNRS, FRE2857, Jouy-en-Josas

Jean-Pierre CRAVEDI, Laboratoire des xénobiotiques, Inra, UMR 1089, Unité Mixte de Recherche Xénobiotiques INRA/ENVT, Centre INRA, Toulouse

Vincent LAUDET, Equipe de zoologie moléculaire, Institut de génomique fonctionnelle de Lyon, UMR 5242 CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INRA, Université Claude Bernard Lyon 1

Gabriel LIVERA, Unité mixte de recherche sur cellules souches et radiations, Inserm U 967, CEA, Université Paris VII, Fontenay-aux-Roses

Rémy SLAMA, Epidémiologie environnementale appliquée à la fertilité et à la reproduction humaine, Inserm U 823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble

Coordination scientifique, éditoriale, bibliographique et logistique

Fabienne BONNIN, attachée scientifique, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Catherine CHENU, attachée scientifique, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Jeanne ETIEMBLE, directrice, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Cécile GOMIS, secrétaire, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Marie-Thérèse LABRO, chargée d'expertise, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Anne-Laure PELLIER, attachée scientifique, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Chantal RONDET-GRELLIER, documentaliste, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Sommaire

Avant-propos	7
---------------------------	---

Introduction	9
---------------------------	---

Analyse

1. Exposition des populations, métabolisme, toxicocinétique	13
2. Etudes épidémiologiques dans l'espèce humaine.....	23
3. Etudes récentes chez les animaux mâles	35
4. Etudes récentes chez l'animal femelle.....	41
5. Effets cellulaires et tissulaires : dysfonctionnement et précancérisation	51
6. Effets chromosomique, génétique et épigénétique.....	61
7. Mécanismes d'action.....	69
8. Relation structure–fonction	77
9. Autres modèles d'études.....	83

Avant-propos

De nombreux facteurs sont susceptibles d'agir directement sur la fertilité ou indirectement via les effets sur le développement de l'appareil reproducteur¹. Parmi ces facteurs, on peut citer le mode de vie, la nutrition, les susceptibilités génétiques. L'exposition à des substances chimiques, en particulier les perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement, constitue un autre type de risque qu'il est important d'explorer.

Des réglementations européennes imposent des interdictions et des restrictions de mise sur le marché et d'usage pour le grand public des substances chimiques ayant été reconnues comme reprotoxiques de catégorie 1² ou 2³. Un certain nombre de substances chimiques (ni cancérigènes ni mutagènes) sont classées à ce jour comme reprotoxiques de catégorie 3⁴. Pour ces dernières, des effets sont possibles mais les preuves sont insuffisantes pour un classement en catégorie 2.

Parmi les bisphénols, le bisphénol A (BPA) classé reprotoxique de catégorie 3 est le plus connu. Ces dernières années, des publications issues de différents laboratoires de recherche indépendants ont attiré l'attention sur des effets possibles du BPA sur la reproduction ainsi que sur d'autres fonctions. Ces travaux ont constitué des signaux d'alerte pour les pouvoirs publics et les agences sanitaires.

Face aux interrogations de la société sur la dangerosité du BPA, la Direction Générale de la Santé a sollicité l'Inserm pour une analyse de ses effets possibles sur la reproduction. Cette analyse s'inscrit dans une expertise collective évaluant plus généralement les effets d'un certain nombre de substances chimiques sur la reproduction. Ce premier bilan sur le BPA sera complété dans le rendu final de l'expertise à l'automne 2010.

Pour répondre à la demande sur le BPA, un groupe pluridisciplinaire d'experts constitué d'épidémiologistes, de chimistes, d'endocrinologues, de biologistes spécialistes de la reproduction, du développement, de génétique moléculaire, a structuré son analyse de la littérature autour des questions suivantes :

- Quelles sont les principales sources et voies d'exposition de la population générale ?
- Quelles sont les données sur l'imprégnation des populations selon le sexe, l'âge et d'autres critères ? Peut-on identifier des populations plus exposées ?
- Qu'indiquent les données de toxicocinétique ?
- Quelles sont les études épidémiologiques chez l'homme et la femme ? Ces études ont-elles mis en relation une exposition au BPA et un effet sur la reproduction ?
- Quels sont les effets observés dans les études expérimentales réalisées chez les rongeurs, d'autres espèces de mammifères ou encore les vertébrés aquatiques aux doses compatibles avec les niveaux d'exposition chez l'homme ?

¹ Jégou B, Jouannet P, Spira A. La fertilité est-elle en danger ? Editions La Découverte, Paris 2009 : 231p

² Substances connues pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine et/ou pour provoquer des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (phrase de risque : R60 ou R61)

³ Substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité humaine et/ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (phrase de risque : R60 ou R61)

⁴ Substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine et/ou pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement (phrase de risque : R62 ou R63)

- Quels sont les effets observés chez l'animal selon les périodes d'exposition (période prénatale, néonatale, prépubertaire, post-pubertaire) ? Peut-on définir des périodes critiques d'exposition ? Ces périodes critiques sont-elles transposables à l'espèce humaine ?
- Quels sont les effets spécifiquement observés au niveau des tissus de l'appareil reproducteur mâle et femelle (y compris tissu mammaire et prostate) dans les études *in vivo* et à partir de culture de cellules (éventuellement humaines) ?
- Des mécanismes spécifiques peuvent-ils être évoqués pour expliquer les effets aux faibles doses ? l'expression de certains gènes est-elle modifiée ? ces modifications sont-elles transmises aux générations suivantes ?
- Les données disponibles sur les relations structure-fonction peuvent-elles éclairer la toxicité des substances de la même famille ?
- Quels sont les principaux axes de recherche à privilégier pour approfondir l'étude des dangers potentiellement liés à l'exposition chronique du BPA en association à de multiples autres substances ?

Introduction

Le bisphénol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane en nomenclature IUPAC) (N°CAS 80-05-7), composé de deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone, appartient à la famille des diphenylalcanes hydroxylés ou bisphénols. Découvert par le chimiste russe Alexandre Dianin en 1891, il provient de la condensation de l'acétone avec deux phénols. La réaction est catalysée par l'acide chlorhydrique ou par une résine de polystyrène.

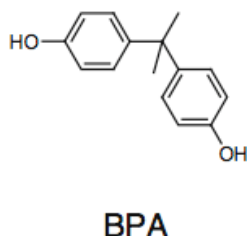


Figure 1 : Structure chimique du bisphénol A (BPA)

Le BPA a fait l'objet de plusieurs évaluations de risque à la demande de différentes agences sanitaires aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis (tableau I). Ces évaluations de risque se sont appuyées principalement sur deux études réalisées par la même équipe (Tyl et coll., 2002, 2008) selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques)⁵. A partir de ces études conduites sur plusieurs générations de rats et souris un NOAEL⁶ de 5 000 µg/kg de poids corporel/j a été établi. Ce NOAEL est établi pour des effets de toxicité systémique. Sur la base de ces travaux, les autorités sanitaires ont défini une dose journalière admissible pour l'Homme de 50 µg/kg/jour en Europe.

Tableau I : NOAEL et doses journalières acceptables (DJA) tirées d'évaluations de risque

Evaluation de risques date/pays	Etude	NOAEL* mg/kg/j	DJA* µg/kg/j
SCF 2002/Europe	Tyl et coll. 2002	5	10
ECB 2003/Europe	Tyl et coll. 2002	50	
AIST 2005/Japon	Tyl et coll. 2002	5 ou 50	

⁵ Bonnes Pratiques de Laboratoire définies par l'OCDE afin d'assurer l'obtention de données d'essai fiables et de grande qualité sur la sécurité des substances industrielles ou des principes actifs pharmaceutiques.

⁶ NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level* ; dose sans effet toxique (dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé)

EFSA 2006 et 2008/Europe	Tyl et coll. 2002, 2008	5	50
ECB 2008 /Europe	Tyl et coll. 2002, 2008	50	
NTP -CERHR 2008/USA	Tyl et coll. 2002, 2008	4,75	
US FDA 2008/USA	Tyl et coll. 2002, 2008	5	
Health Canada 2008/Canada	Tyl et coll. 2002, 2008	5	

*NOAEL : « No Observable Adverse Effect Level »= dose sans effet toxique (dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé ; DJA : dose journalière acceptable.

Depuis quelques années, un débat sur les risques liés à l'exposition au BPA agite la communauté scientifique entre les tenants de la toxicologie réglementaire et les endocrinologues (Myers et coll., 2009). Ce débat concerne essentiellement les effets du BPA à de faibles doses. Classiquement, les effets des substances chimiques sont décrits comme suivant une courbe monotone dose réponse. Cependant, pour certains scientifiques, les substances chimiques environnementales dont le BPA ayant une activité hormonale ne répondraient pas à ce principe et pourraient provoquer à de faibles doses des effets opposés à ceux observés à fortes doses.

Des mécanismes impliquant différents récepteurs sous-tendent ces effets opposés, les récepteurs pouvant être stimulés à faibles doses et inhibés à fortes doses.

Ces données récentes soulignent que les effets aux doses environnementales ne peuvent être prédits par des études chez l'animal à fortes doses.

Dans le contexte ci-dessus évoqué, le groupe d'experts a mené son analyse sur les effets du BPA en concentrant son attention sur les études récentes (privilégiant les études des cinq dernières années) réalisées aux doses inférieures au NOAEL et il s'est tout particulièrement intéressé aux périodes d'exposition. Au-delà des critères morphologiques, il a analysé les effets au niveau des tissus et des cellules de l'appareil reproducteur mâle et femelle et tenter de comprendre les mécanismes en cause.

Un certain nombre de limites afférentes aux études doivent être souligné d'emblée. Les études chez l'animal ont été réalisés principalement chez les rongeurs (rat et souris) mais il est difficile de trouver deux études ayant recherché les mêmes effets sur les mêmes souches de souris ou de rat. Les paramètres phénotypiques ou les effets biologiques étudiés ainsi que les techniques mises en œuvre pour les mesurer ne sont pas standardisés. Il est donc souvent difficile de comparer les résultats de ces études.

Les fenêtres d'exposition sont diverses avec des expositions continues depuis la gestation se poursuivant à l'âge adulte et dans les générations suivantes ou des expositions limitées à une période précise du développement par exemple pendant la période gestationnelle, néonatale, prépubertaire, post-pubertaire... Les modes d'administration du BPA varient selon les études (ingestion orale, injection sous cutanée, intra-musculaire...). Certaines études ne précisent pas si les aliments et la boisson des animaux sont contrôlés du point de vue de leur contamination par des perturbateurs endocriniens autres que le BPA, et aucune ne tient compte de l'exposition des animaux avant leur mise en reproduction. Cependant, dans les animaleries de rongeurs, les sources de contaminants environnementaux ne manquent pas (alimentaires - mycotoxines, pesticides - ou contaminants présents dans l'air, les litières ou l'eau de boisson, voire dans les produits utilisés pour nettoyer et désinfecter les cages...).

Dans aucune étude, il n'est effectué un dosage de BPA chez les animaux avant la mise en expérimentation.

Ces remarques s'appliquent tout autant aux études toxicologiques réglementaires menées selon des protocoles standardisés (lignes OCDE) qu'aux études réalisées dans les laboratoires académiques. Les études commandées par les agences sont réalisées sur un nombre important d'animaux qui leur confèrent une grande puissance statistique mais elles sont essentiellement fondées sur des critères morphologiques (poids bruts d'organes, parfois histologie). Soulignons également que toutes les études ne comportent pas de témoins « positifs » (diéthylstilbestrol, ethinyloestradiol, 17 β œstradiol ...).

Enfin, aucune étude à ce jour, n'applique de nouvelles approches (transcriptome, protéome, métabolome, ...) avec des méthodes plus sensibles (microarrays, quantitative RT-PCR, Chip, mesure des niveaux de méthylation...) qui permettraient de mettre en évidence des effets plus fins que ceux observés dans les études fondées sur l'analyse morphologique.

Les quelques études réalisées chez l'homme restent peu informatives quant aux effets à long terme du BPA. Même si, l'une d'elles montre une corrélation entre l'augmentation du taux de BPA retrouvé dans les urines et les troubles de la fonction sexuelle ou pour une autre avec le taux d'hormone mâle, il faut souligner que le taux urinaire mesuré lors de l'étude ne reflète guère une exposition chronique au BPA. Or, les travaux expérimentaux soulignent l'importance de la période d'exposition sur les effets à l'âge adulte. Aucune des études ne porte sur l'exposition durant la grossesse.

Malgré leurs limites, ces études sur l'animal ou l'Homme, à l'échelle tissulaire ou moléculaire apportent des enseignements que le groupe d'experts, a tenté d'exploiter pour discuter la dangerosité potentielle du BPA en matière de reproduction.

1

Exposition des populations, métabolisme, toxicocinétique

Largement présent dans notre environnement quotidien, le bisphénol A (BPA) se retrouve dans le sang et l'urine de la quasi-totalité des populations occidentales. Bien que rapidement éliminé, le BPA est présent à niveau constant dans l'organisme du fait de l'exposition continue. La principale voie d'exposition évoquée est l'alimentation mais peut-être d'autres voies ne sont-elles pas à négliger. Les différences inter-espèces dans les processus d'élimination du BPA justifient d'être prudent dans la transposition à l'homme des résultats toxicologiques obtenus chez les rongeurs.

Sources et production

Le BPA est utilisé comme monomère dans la fabrication industrielle, par polymérisation, de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. Les polycarbonates entrent dans la composition d'un très grand nombre d'objets courants (CD, lunettes, bouteilles plastiques, biberons), alors que les résines époxy sont principalement utilisées pour réaliser le revêtement intérieur des boîtes de conserves ou les amalgames dentaires. Le BPA intervient également comme inhibiteur de polymérisation pour le PVC, comme antioxydant dans les plastifiants ou encore comme agent actif dans les papiers thermosensibles. Enfin, le BPA sert à la fabrication d'un ignifugeant capable de retarder la prise de feu des matières plastiques et des textiles : le tétrabromobisphénol A.

Le BPA est une substance chimique fabriquée en grande quantité (*High Production Volume*). Selon les données fournies par l'industrie (*Plastics Europe*), la production mondiale est supérieure à 3 millions de tonnes par année. Le BPA n'est pas produit en France mais dans l'Union européenne à hauteur de 700 000 tonnes par an pour une consommation totale à l'intérieur de l'Union européenne. Environ 75 % de la production européenne est destinée à la fabrication de polycarbonate. D'après les données de 2005 et 2006, 1,15 million de tonnes de BPA sont utilisés par année dans l'Union européenne.

Modalités et voies d'exposition

Selon les agences d'évaluation du risque (EFSA, 2004 et 2006 ; NTP-CERHR, 2008), la principale voie d'exposition de la population générale est la voie alimentaire. Dans la mesure où le BPA est un constituant des polymères plastiques utilisés pour emballer ou contenir les aliments, cette exposition relève d'une part des monomères résiduels de BPA présents dans ces matériaux et susceptibles de migrer dans l'aliment, et d'autre part du BPA qui peut être libéré par l'hydrolyse du polymère, en particulier au cours du chauffage, comme cela peut se produire pour les biberons en polycarbonate par exemple. Cette migration est d'autant plus importante que le polycarbonate a été utilisé à de nombreuses reprises (Brede et coll., 2003) ou qu'il est au contact de solutions alcalines (Biedermann-Brem et Grob, 2009). Dans des conditions normales d'utilisation d'un biberon, cette migration est de quelques µg/l d'eau ou

de lait (Maragou et coll., 2008). Chez les adultes, la consommation de boissons contenues dans des bouteilles en polycarbonates (Carwile et coll., 2009), d'aliments en conserve (Mariscal-Arcas et coll., 2009 ; Lim et coll., 2009b) ou de denrées chauffées au micro-onde dans leur emballage plastique (Lim et coll., 2009a) se traduit par des valeurs d'exposition moyennes voisines de 0,033 µg/kg de poids corporel /j alors qu'elles sont environ 25 fois plus élevées pour le nourrisson nourri au biberon en polycarbonate (von Goetz et coll., 2010) soit 0,800 µg/kg/j. Cette dose est très inférieure à la dose journalière admissible pour l'homme (50 µg/kg/j) mais compatible avec des expositions étudiées chez l'animal et décrites dans les chapitres suivants. Les autres modalités d'exposition telles que celles provenant de la manipulation de papiers thermosensibles ou encore l'inhalation de poussières contaminées par du BPA sont peu documentées et sont considérées comme négligeables pour le consommateur (EFSA, 2004 ; NTP-CERHR, 2008). En ce qui concerne ce deuxième point, peu de données existent sur l'absorption par inhalation ainsi que sur les niveaux de contamination de l'air. Toutefois, des travaux récents indiquent que les poussières domestiques peuvent contenir plus de 15 000 µg/kg de BPA (Völkel et coll., 2008 ; Geens et coll., 2009) et que cette valeur peut être 5 fois plus élevée pour des poussières collectées dans des bureaux (Geens et coll., 2009). Par ailleurs, les calculs d'estimation de l'absorption cutanée du BPA font mention d'une valeur de 10 % de la dose appliquée (European commission, 2003), ce que semble confirmer les travaux de Kaddar et coll. (2008) à partir d'un modèle de peau de porc. Cependant, des données préliminaires obtenues sur des explants de peau humaine tendent à montrer que ce taux est largement sous estimé (Cravedi, communication personnelle).

Plusieurs auteurs ont étudié l'exposition faisant suite à l'application de scellements dentaires à base d'amalgames composés de BPA. Olea et coll. (1996) ont mesuré les concentrations salivaires en BPA chez des patients auxquels avaient été appliqués des amalgames composés de bis-glycidyl diméthacrylate et de bisphénol A-diméthylacrylate. Les niveaux de BPA salivaire observés chez 17 patients variaient de 3 000 à 30 000 µg/l de salive. Joskow et coll. (2006) ont pu mesurer les concentrations en BPA dans la salive et dans l'urine de 14 patients ayant reçu des scellements dentaires de différente nature. Les concentrations moyennes mesurées dans la salive étaient respectivement de 0,54 et 42,8 µg/l, alors que les concentrations urinaires maximales étaient observées une heure après l'application et correspondaient respectivement à 7,26 et 27,3 µg/l, de 2 à 10 fois supérieurs aux taux moyens habituellement observés (voir paragraphe ci-dessous).

Imprégnation des populations humaines

Les mesures de concentrations de BPA effectuées dans le sang, l'urine, le lait maternel et d'autres tissus humains confirment que les populations occidentales présentent, dans leur très large majorité, des niveaux détectables de BPA.

Mesures dans le sang

Des mesures ont été réalisées chez les femmes enceintes ou en suites de couche. Sur la base d'analyses en LC-MS/MS effectuées sur des prélèvements sanguins pratiqués chez 40 femmes du Michigan au moment de l'accouchement, Padmanabhan et coll. (2008) ont observé des niveaux plasmatiques en BPA inchangés variant de 0,5 (limite de détection) à 22,3 µg/l (moyenne=5,9 µg/l). Dans une étude analogue portant sur 300 femmes coréennes au moment de l'accouchement, Lee et coll. (2008) ont trouvé des concentrations plasmatiques comprises entre la limite de détection et 66,48 µg/l alors que dans le sang du cordon, les

valeurs ne dépassaient pas 8,86 µg/l. Ces valeurs sont sensiblement plus élevées que celles relevées par Chapin et coll. (2008) dans leur revue bibliographique dans laquelle les concentrations plasmatiques moyennes chez les femmes enceintes ne dépassent pas 4,4 µg/l.

En se fondant sur des données pharmacocinétiques qui seront détaillées plus loin, Goodman et coll. (2009) soulignent l'incohérence entre ces valeurs de concentration plasmatiques et les données d'exposition (en µg/kg/jour) actuellement disponibles. De même, les modèles PB-PK appliqués par Mielke et Gundert-Remy (2009) font apparaître que les scénarios d'exposition mettant en jeu les doses les plus élevées devraient conduire à des niveaux plasmatiques circulant en BPA cent fois plus faibles que ceux qui sont rapportés dans la littérature. Cette incohérence a conduit beaucoup d'équipes à préférer l'utilisation des quantités totales de bisphénol A éliminées dans l'urine comme marqueur d'exposition à ce contaminant.

Mesures dans l'urine

Dans l'étude réalisée sur 2 517 sujets de la cohorte « *National Health and Nutrition Examination Survey* » (NHANES) III, des échantillons d'urine ont été analysés en LC-MS/MS. Les résultats montrent que le BPA est présent dans l'urine de 93 % des Américains (Calafat et coll., 2008). La concentration urinaire moyenne tous âges confondus est de $2,6 \pm 0,3$ µg/l. Cette étude montre par ailleurs que les niveaux de BPA urinaire total diffèrent en fonction de l'âge (figure 1), de la race, du sexe et du lieu d'habitation.

Concentration urinaire de BPA (µg/l)

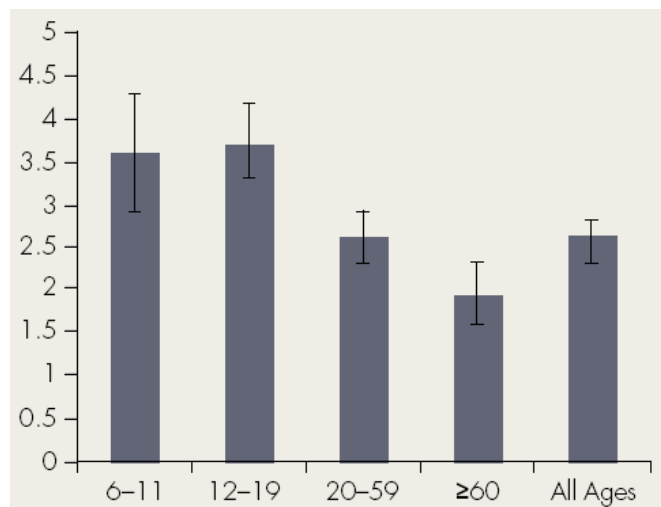


Figure 1 : Concentrations urinaires de BPA dans différentes tranches d'âge de la population générale aux Etats-Unis (valeurs= moyennes ± écart type, n total = 2517) (d'après Calafat et coll., 2008)

Ces mêmes auteurs ont procédé à l'analyse en LC-MS/MS des urines de 40 nourrissons prématurés placés en soins intensifs (Calafat et coll., 2009). Chez ces enfants, les niveaux de BPA total urinaire s'élèvent à $30,3 \pm 5,2$ µg/l, démontrant la surexposition aux monomères des plastiques à laquelle sont soumis ces bébés, sans que la source ait pu être déterminée de façon précise.

En Allemagne, une étude menée chez 599 enfants âgés de 3 à 14 ans fait apparaître des taux urinaires moyens de BPA total de 2,7 µg/l (Becker et coll., 2009). Ce sont chez les enfants les plus jeunes (3-5 ans) que les concentrations les plus élevées ont été observées (3,5 µg/l).

Estimation de l'exposition à partir des mesures urinaires

A partir des données produites par Calafat et coll. (2008) évoquées précédemment, Lakind et Naiman (2008) ont calculé des niveaux d'exposition au BPA fondés sur les modèles pharmacocinétiques disponibles. Ces estimations correspondent à des moyennes de 0,0334 – 0,0563 µg/kg poids corporel/j pour des adultes de 20 à 60 ans et de 0,0674 µg pour des enfants de 6 à 11 ans. Ces valeurs sont conformes aux estimations des expositions établies sur la base des consommations alimentaires mentionnées précédemment (von Goetz et coll., 2010).

Mesures dans le lait et le liquide amniotique

Quelques auteurs ont également trouvé des teneurs mesurables de BPA dans le lait. Calafat et coll. (2006) rapportent des concentrations médianes d'environ 1,4 µg de BPA total/l chez 32 sujets. Ye et coll. (2006) ont détecté du BPA dans 18 échantillons sur 20. Dans 12 échantillons la présence de BPA inchangé a été détectée (médiane des concentrations=0,4 µg/l) alors que la médiane des concentrations en BPA totale était de 1,1 µg/l.

Engel et coll. (2006) ont mesuré les concentrations de BPA dans le liquide amniotique à partir de 21 échantillons prélevés au cours d'amniocentèses effectuées avant la 20^e semaine de grossesse. Le BPA a été détecté dans 10 % des échantillons à l'aide d'un système HPLC équipé d'un détecteur électrochimique. Des concentrations comprises entre la limite de détection (0,5 µg/l) et 1,96 µg/l ont été observées.

Mesure dans le tissu adipeux

Le BPA a été mesuré dans différents tissus chez l'homme, parmi lesquels le tissu adipeux. Olea et coll. (2008) ont montré que les teneurs dans le tissu adipeux étaient en moyenne de $17,46 \pm 14,82$ µg/kg de tissu adipeux chez l'enfant.

La rétention de BPA dans le tissu adipeux a également été observée chez l'animal. Nunez et coll. (2001) ont mesuré les résidus de BPA dans le tissu adipeux de rates ovariectomisées ayant reçu pendant 15 jours une dose sous cutanée de BPA (1 mg/j) administrée par une pompe osmotique. Les valeurs obtenues en fin d'expérimentation indiquent des niveaux de BPA pouvant dépasser 3 000 µg/kg dans le tissu adipeux brun et 100 µg/kg pour le tissu adipeux péri-ovarien.

Métabolisme et toxicocinétique

Le métabolisme du BPA chez l'homme et dans les différentes espèces utilisées dans les études toxicologiques est important à connaître pour évaluer l'éventuelle toxicité du BPA et pour discuter les possibles transpositions de l'animal à l'homme.

Il s'agit de savoir si cette substance est bioaccumulable, convertie en une molécule plus active (activation métabolique) ou au contraire moins active (détoxification métabolique).

Conjugaison, élimination

Les expérimentations menées chez l'homme adulte montrent que le BPA est totalement absorbé par la voie digestive. Il est ensuite pris en charge par les enzymes de biotransformation intestinales et hépatiques, principalement celles responsables de la conjugaison des xénobiotiques.

Völkel et coll. (2002) ont administré sous forme de gélule 5 000 μ dose unique de BPA marqué au deutérium à des volontaires humains des deux sexes. Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à intervalles réguliers au cours des heures qui ont suivi l'administration et ces échantillons ont fait l'objet d'analyses en GC-MS/MS et LC-MS/MS avant et après hydrolyse à la β -glucuronidase. Les résultats obtenus indiquent que le pic plasmatique est atteint environ 80 minutes après l'ingestion (concentration=800 nmol/l) et que le BPA circulant est presque exclusivement sous la forme de conjugué à l'acide glucuronique (BPA-glucuronique).

Le BPA-glucuronide est rapidement éliminé dans l'urine et aucun autre métabolite n'a été retrouvé par ces auteurs. Ces travaux indiquent que l'ingestion orale de 5 000 μ g de BPA correspondant à des doses variant de 50 à 90 μ g/kg) conduit à des concentrations circulantes pouvant atteindre 800 nmol/l et des concentrations urinaires d'environ 4 400 μ g/l (valeur observée dans les urines prélevées au cours des 6 premières heures). La même équipe (Völkel et coll., 2005) a répété l'expérimentation en donnant une dose plus faible (25 μ g de BPA administré dans l'eau de boisson à six volontaires). Les niveaux urinaires ont été mesurés au cours des 7 h suivant l'ingestion, indiquant des concentrations maximales de 9,6 μ g/l (valeurs obtenues pour les échantillons 0 - 3 heures). Des travaux analogues menés par Tsukioka et coll. (2004) chez un seul individu recevant par voie orale 100 μ g de BPA deutéré indiquent une concentration urinaire maximale de 90 μ g/l (30 minutes après le traitement).

Ces travaux démontrent chez l'homme adulte une élimination rapide et complète du BPA dans l'urine sous forme de BPA-glucuronide, mais ne reflètent pas forcément les conditions d'exposition chronique au BPA de la population générale. Par ailleurs, on ne sait pas si ces données sont extrapolables au nourrisson, plus exposé et plus sensible que l'adulte au BPA. En outre, plusieurs études d'exposition révèlent la présence de BPA libre dans l'urine pour environ 10 % des échantillons (Ye et coll., 2005 ; Völkel et coll., 2008). Ce résultat, qui dépend en grande partie de la sensibilité, la spécificité et la robustesse de la méthode utilisée pour l'analyse des résidus, a été l'objet de controverses (Dekant et Vökel, 2008). Il ne peut, en effet, pas être exclu que les traces de BPA libre retrouvées dans l'urine puissent provenir de contaminations au cours de l'analyse elle-même (Völkel et coll., 2008) ou encore de l'hydrolyse du conjugué après le prélèvement urinaire, libérant de ce fait le composé parent (Waechter et coll., 2007).

Toxicocinétique

En dépit des données nombreuses dont on dispose sur la toxicocinétique du BPA chez l'animal et l'homme, plusieurs zones d'ombre subsistent. En premier lieu figure le fait qu'au cours du jeûne, compte tenu de la demi-vie du BPA de 4-6h et de l'exposition supposée essentiellement alimentaire à cet agent chimique, il devrait être observé une diminution graduelle des niveaux d'excrétion urinaire du BPA et/ou de ses métabolites. D'après Stahlhut et coll. (2009) un jeûne de 24 h n'a pas d'effet significatif sur les taux d'élimination totale du BPA (libre + conjugué) dans l'urine. En effet, les concentrations médianes observées chez 129 sujets de la cohorte américaine NHANES sont de 2,6 μ g/g de créatinine pour les prélèvements 0-4,5 h et pour 899 individus de 2,4 μ g/g de créatinine pour les prélèvements 8,5-24 h après le début du jeûne. Ces données suggèrent aux auteurs que l'exposition alimentaire n'est pas nécessairement prépondérante, que les cinétiques d'élimination observées pour une dose unique ne sont peut être pas extrapolables à l'exposition continue, que le BPA pourrait être retenu dans un compartiment tel que le tissu adipeux, ou encore que le BPA urinaire pourrait provenir d'autres contaminants que le BPA (par exemple les BPA halogénés). Il faut souligner que dans cette étude, les modélisations de l'élimination

urinaire ont été faites à partir d'un seul dosage par individu, ce qui semble insuffisant pour tirer des conclusions.

Différences inter-espèces dans les processus d'élimination

Si les données expérimentales obtenues chez l'animal confirment que le BPA est rapidement absorbé dans le tube digestif et qu'il est rapidement éliminé, elles font également apparaître des différences entre les rongeurs, chez lesquels a été réalisé le plus grand nombre d'études, et l'homme. Les extrapolations des données de pharmacocinétiques de l'animal à l'homme sont rendues délicates en raison d'importantes différences inter-espèces pour ce qui concerne l'existence ou non d'un cycle entérohépatique dans le processus d'élimination du BPA conjugué à l'acide glucuronique. En effet, chez le rat ce métabolite est éliminé pour partie dans la bile pour être, après hydrolyse dans la lumière intestinale, réabsorbé par la paroi intestinale (Upmeier et coll., 2000 ; Kurebayashi et coll., 2003). Ce processus n'a pas lieu chez l'homme, ce qui a pour conséquence une élimination urinaire plus rapide. De ce fait, la demi-vie du BPA chez l'homme est de 4 à 6 heures (Völkel et coll., 2002, 2005) et l'élimination est complète en 24 heures, alors que les données chez le rat font état d'une demi-vie comprise entre 24 et 48 heures (Kurebayashi et coll., 2003 ; Upmeier et coll., 2003).

En outre, chez le rat c'est majoritairement l'isoforme 2B1 de l'UDP-glucuronosyl transférase (UGT2B1) qui prend en charge la glucuronidation du BPA (Yokota et coll., 1999). Chez l'homme, c'est principalement l'UGT2B15 qui est responsable de cette glucuro-conjugaison (Hanioka et coll., 2008). Le polymorphisme génétique de l'UGT2B15 pourrait entraîner d'importantes variabilités interindividuelles en matière de capacité de détoxication du BPA chez l'homme. S'il est vrai que l'expression des UGT est limitée chez le fœtus et pendant les premiers jours de la vie, ces enzymes sont suffisamment actives pour métaboliser de faibles doses de BPA comme le montre l'étude de Calafat et coll. (2009), qui a mis en évidence des glucuro-conjugués du BPA dans les urines de nourrissons prématurés.

Les voies de biotransformation du BPA sont également de nature et d'intensité différentes selon les espèces. Les données recueillies chez l'Homme montrent que le BPA-glucuronide est le métabolite majoritaire puisqu'il représente plus de 90 % de la forme circulante et des métabolites urinaires. Le BPA-sulfate est plus rarement identifié et quantifié. Kim et coll. (2003) ont démontré chez des sujets coréens masculins (N=15) et féminins (N=15) que le BPA-sulfate était bien présent. Chez les hommes, les niveaux de BPA sulfate et BPA glucuronide étaient respectivement de $0,49 \pm 0,27$ et $2,34 \pm 0,85$ $\mu\text{g/l}$ alors que chez les femmes ces concentrations étaient respectivement de $1,20 \pm 0,32$ et $1,0 \pm 0,34$ $\mu\text{g/l}$. Ces deux formes représentent des voies de détoxication du BPA dans la mesure où elles ne sont pas actives sur les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, on peut s'interroger sur la possibilité d'une déconjugaison dans certains organes cibles de ces métabolites. Très récemment, Nishikawa et coll. (2010) ont en effet montré chez des rates en gestation dont l'utérus a été perfusé par de faibles doses de BPA-glucuronide que la déconjugaison de ce métabolite avait bien lieu dans le liquide amniotique et le fœtus, libérant de ce fait du BPA. Chez le rongeur, la conjugaison à l'acide glucuronique représente bien la voie majoritaire, mais l'aglycone n'est pas exclusivement du BPA inchangé, mais pour partie du BPA hydroxylé (Zalko et coll., 2003). Plusieurs autres métabolites ont néanmoins été identifiés, tels que le BPA diglucuronide, ou des conjugués méthoxylés (Zalko et coll., 2003).

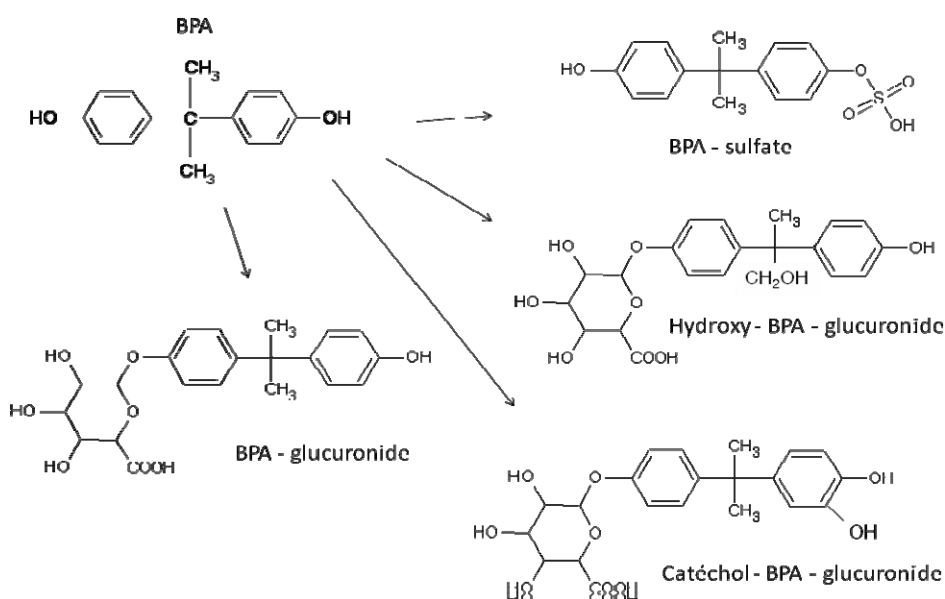


Figure 2 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (chez l'homme, la voie prépondérante est celle qui conduit au BPA-glucuronide)

Différences inter-espèces dans les liaisons aux protéines plasmatiques

Un élément déterminant des caractéristiques pharmacocinétiques des perturbateurs endocriniens en général et du BPA en particulier repose sur les capacités du composé à se lier aux protéines plasmatiques. La forme liée du BPA inchangé représente environ 90 à 95 % du BPA circulant et la forme libre environ 5 à 10 % du total (Csanady et coll., 2002; Kurebayashi et coll., 2002 ; Mayersohn, 2003). L'Homme et le singe semblent disposer d'une fraction libre réduite (5 %) (Csanady et coll., 2002) en comparaison du rat (5 à 10 %) (Mayersohn, 2003). L'impact de cette liaison aux protéines au regard de la biodisponibilité du BPA vis-à-vis des tissus cibles potentiels, en particulier ceux qui ne disposent pas de capacités métaboliques importantes telles que le cerveau ou l'utérus, peut être déterminant en matière de toxicité. En effet, cette liaison est de nature à moduler non seulement les capacités d'accès du BPA au niveau de l'organe, mais également son accessibilité aux récepteurs nucléaires ou membranaires. De même, l'affinité de liaison du BPA à l' α -foetoprotéine est susceptible de conditionner la bioaccessibilité de ce composé vis-à-vis du fœtus. Les données publiées par Milligan et coll. (1998) indiquent que le BPA a une très faible affinité pour l' α -foetoprotéine humaine, ce qui laisse supposer une incapacité à déplacer les ligands endogènes tels que l'œstradiol et donc à provoquer des effets biologiques de ces stéroïdes sur le fœtus. En revanche, cette faible liaison protège mal le fœtus des effets directs du BPA.

En conclusion, les taux urinaires de BPA sont respectivement de 2,5 µg/kg/j chez l'adulte et de 3,5 µg/kg/j chez les enfants. Les estimations à partir de ces données donnent des niveaux d'exposition de l'ordre de 0,03 µg/kg/j de BPA chez l'adulte, de 0,07 µg/kg/j chez l'enfant de 6-11 ans. Une autre étude évalue l'exposition des nourrissons nourris aux biberons à 0,75 µg/kg/j.

La demi-vie du BPA chez l'homme de 4-6 heures est plus courte que chez le rat 24-48 heures en raison d'un métabolisme entéro hépatique chez le rat qui n'existe pas chez l'homme. La conjugaison est la principale voie de détoxification du BPA. Les formes conjuguées ne sont

plus actives sur les récepteurs aux œstrogènes mais des déconjugaisons libérant du BPA ont été observées au niveau du liquide amniotique et du fœtus.

BIBLIOGRAPHIE

- BECKER K, GUEN T, SEIWERT M, CONRAD A, PICK-FUSS H, et coll. GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009, **212** : 685-692
- BIEDERMANN-BREM S, GROB K. Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor. *European Food Research and Technology* 2009, **228** : 679-684
- BREDE C, FJELDAL P, SKJEVRAK I, HERIKSTAD H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam* 2003, **20** : 684-689
- CALAFAT AM, WEUVE J, YE X, JIA LT, HU H, et coll. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 639-644
- CALAFAT AM, YE X, WONG LY, REIDY JA, NEEDHAM LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 39-44
- CARWILE JL, LUU HT, BASSETT LS, DRISCOLL DA, YUAN C, et coll. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1368-1372
- CHAPIN RE, ADAMS J, BOEKELHEIDE K, GRAY LE, JR., HAYWARD SW, et coll. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008, **83** : 157-395
- CSANADY GA, OBERSTE-FRIELINGHAUS H, SEMDER B, BAUR C, SCHNEIDER K, FILSER JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 2002, **76** : 299-305
- DEKANT W, VÖLKE W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **228** : 114-134
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to the introduction of a Fat (consumption) Reduction Factor for infants and children (Question No EFSA-Q-2003-070) Adopted on 5 October 2004. *The EFSA Journal* 103, 1-8
- EFSA (2006) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A). Question number EFSA-Q-2005-100. Adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* (2006) 428, 1 - 75
- ENGEL SM, LEVY B, LIU Z, KAPLAN D, WOLFF MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2006, **21** : 110-112
- EUROPEAN COMMISSION. European Union Risk assessment Report. CAS No: 80-05-7 EINECS No: 201-245-8 - 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol A). European commission (Ed). 2003 : 302p
- GEENS T, ROOSENS L, NEELS H, COVACI A. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 2009, **76** : 755-760
- GOODMAN JE, WITORSCH RJ, MCCONNELL EE, SIPES IG, SLAYTON TM, et coll. Weight-of-evidence evaluation of reproductive and developmental effects of low doses of bisphenol A. *Crit Rev Toxicol* 2009, **39** : 1-75
- HANIOKA N, NAITO T, NARIMATSU S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 2008, **74** : 33-36
- KADDAR N, HARTHE C, DECHAUD H, MAPPUS E, PUGEAT M. Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A* 2008, **71** : 471-473

- KIM YH, KIM CS, PARK S, HAN SY, PYO MY, YANG M. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 312 : 441-448
- KUREBAYASHI H, BETSUI H, OHNO Y. Disposition of a low dose of 14Cbisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 2003, 73 : 17-25
- KUREBAYASHI H, HARADA R, STEWART RK, NUMATA H, OHNO Y. Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2002, 68 : 32-42.
- LEE YJ, RYU HY, KIM HK, MIN CS, LEE JH, et coll. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008, 25 : 413-419
- LIM DS, KWACK SJ, KIM KB, KIM HS, LEE BM. Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A* 2009a, 72 : 1285-1291
- LIM DS, KWACK SJ, KIM KB, KIM HS, LEE BM. Risk assessment of bisphenol A migrated from canned foods in Korea. *J Toxicol Environ Health A* 2009b, 72 : 1327-1335
- MARAGOU NC, MAKRI A, LAMPI EN, THOMAIDIS NS, KOUPPARIS MA. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008, 25 : 373-383
- MARISCAL-ARCAS M, RIVAS A, GRANADA A, MONTEAGUDO C, MURCIA MA, et coll. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol* 2009, 47 : 506-510
- MAYERSOHN M. Bisphenol A : Characterization of Plasma Protein Binding in Rats. College of Pharmacy, University of Ariszona, Tuscon, Arizona, 2003
- MIELKE H, GUNDERT-REMY U. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett* 2009, 190 : 32-40
- MILLIGAN SR, KHAN O, NASH M. Competitive binding of xenobiotic estrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol* 1998, 112 : 89-95
- NISHIKAWA M, IWANO H, YANAGISAWA R, KOIKE N, INOUE H, et coll. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ Health Perspect* 2010, Ahead of print 09 April 2010
- NTP-CERHR. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Bisphenol A. NIH PUBLICATION (Ed). 2008 : 300p
- NUNEZ AA, KANNAN K, GIESY JP, FANG J, CLEMENS LG. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 2001, 42 : 917-922
- OLEA N, ARREBOLA JP, TAOUFIKI J, FERNANDEZ-VALADES R, PRADA R, et coll. Alkylphenols and bisphenol-A and its chlorinated derivatives in adipose tissue of children. In : ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY II. 110, KUNGOLOS A, ZAMORANO M (Eds). Wit transactions on ecology and the environment, WIT Press, 2008 : 129-138
- OLEA N, PULGAR R, PEREZ P, OLEA-SERRANO F, RIVAS A, NOVILLO-FERTRELL A, PEDRAZA V, SOTO AM, SONNENSCHNEIN, C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996, 104 : 298-305
- PADMANABHAN V, SIEFERT K, RANSOM S, JOHNSON T, PINKERTON J, et coll. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 2008, 28 : 258-263
- POTTENGER L, DOMORADZKI J, MARKHAM D, HANSEN S, CAGEN S, WAECHTER J JR. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 2000, 54 : 3-18
- STAHLHUT RW, WELSHONS WV, SWAN SH. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect* 2009, 117 : 784-789

- TSUKIOKA T, BROCK J, GRAISER S, NGUYEN J, NAKAZAWA H, MAKINO T. Determination of trace amounts of bisphenol A in urine by negative-ion chemical ionization-gas-chromatography/mass spectrometry. *Anal Sci* 2003, **19** : 151-153
- UPMEIER A, DEGEN G, DIEHL P, MICHNA H, BOLT H. Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch Toxicol* 2000, **74** : 431-436
- VÖLKEL W, BITTNER N, DEKANT W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2005 **33** : 1748-1757
- VÖLKEL W, COLNOT T, CSANADY GA, FILSER JG, DEKANT W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002, **15** : 1281-1287
- VÖLKEL W, KIRANOGLU M, FROMME H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett* 2008, **179** : 155-162
- VON GOETZ N, WORMUTH M, SCHERINGER M, HUNGERBUHLER K. Bisphenol A: How the Most Relevant Exposure Sources Contribute to Total Consumer Exposure. *Risk Anal* 2010,
- WAECHTER J, THORNTON C, MARKHAM D, DOMORADZKI J. Factors affecting the accuracy of bisphenol A and bisphenol A-monoglucuronide estimates in mammalian tissues and urine samples. *Toxicol Mech Methods* 2007, **17** : 13-24
- YE X, KUKLENYIK Z, NEEDHAM LL, CALAFAT AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006, **831** : 110-115
- YOKOTA H, IWANO H, ENDO M, KOBAYASHI T, INOUE H, IKUSHIRO S, YUASA A. Glucuronidation of the environmental estrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 1999, **340** : 405-409
- ZALKO D, SOTO AM, DOLO L, DORIO C, RATHAHAO E, et coll. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 309-319

2

Etudes épidémiologiques dans l'espèce humaine

Au cours des dix dernières années, quelques études épidémiologiques ont été réalisées pour documenter l'impact sanitaire potentiel de l'exposition au bisphénol A (BPA) dans l'espèce humaine, notamment pour apprécier les conséquences d'une exposition sur la fonction de reproduction chez l'homme et la femme.

Effets sur la fonction de reproduction masculine

Deux études réalisées à Aichi (Japon) en milieu professionnel et auprès d'hommes consultant pour infertilité dans un service hospitalier du Massachusetts (États-Unis) ont caractérisé l'association entre l'exposition au BPA et la concentration plasmatique de certaines hormones gonadotropes ou gonadiques (Hanaoka et coll., 2002 ; Meeker et coll., 2010).

Une étude réalisée en Chine entre 2004 et 2008 a comparé la fonction sexuelle de travailleurs potentiellement exposés au bisphénol A avec celle de travailleurs non exposés (Li et coll., 2010a; Li et coll, 2010b).

Hormones gonadotropes, gonadiques et thyroïdiennes

L'étude réalisée par Hanaoka et coll. (2002) dans la préfecture d'Aichi reposait sur une approche transversale auprès de 42 travailleurs utilisant le diglycidyléther de bisphénol A (bisphenol A diglycidyl ether, ou BADGE) mélangé à des solvants organiques afin de durcir des résines époxy, recrutés dans 3 usines, qui ont été comparés à 42 travailleurs des mêmes usines mais qui n'utilisaient pas de BADGE. Les travailleurs non exposés ont été appariés aux travailleurs exposés en termes d'âge (à 3 ans près) et de nombre de cigarettes fumées quotidiennement. Un prélèvement urinaire a eu lieu entre 10 et 12 h du matin afin de doser la concentration en BPA et en métabolites de solvants organiques auxquels les travailleurs étaient potentiellement exposés ; une prise de sang le même jour a permis le dosage des concentrations plasmatiques de 3 hormones (LH, FSH et testostérone). Le niveau médian de bisphénol A était environ le double pour les travailleurs utilisant le BADGE que pour ceux ne l'utilisant pas ; la moyenne était supérieure de 2,5 $\mu\text{Mol}/\text{Mol}$ de créatinine pour les exposés ($p=0,002$) (tableau I).

Les niveaux médians de LH et testostérone libre étaient similaires chez les travailleurs exposés au BADGE et ceux qui ne l'étaient pas. La concentration de FSH plasmatique tendait à diminuer en fonction de la concentration urinaire de bisphénol A ($p=0,05$, après ajustement sur l'âge et la consommation d'alcool), mais apparemment pas sur les concentrations des métabolites des solvants organiques. La concentration urinaire d'acide 2-butoxyacétique, métabolite du 2-méthoxy éthanol (solvant organique), dosé lui aussi dans les urines, tendait également à être associée au niveau de FSH plasmatique ($p=0,12$).

La corrélation entre le bisphénol A et l'acide 2-butoxyacétique (probable car les auteurs indiquent que le BADGE est utilisé conjointement à des solvants organiques) n'a pas été

rapportée, ce qui ne permet pas d'apprécier complètement dans quelle mesure ce métabolite pouvait expliquer l'association statistique entre bisphénol A et FSH.

Une thématique similaire a été étudiée dans l'étude réalisée dans le Massachusetts par Meeker et coll. (2010), qui concernait des hommes consultant pour infertilité et a priori non exposés professionnellement. L'étude américaine s'est intéressée à davantage de paramètres hormonaux, et notamment l'inhibine B (marqueur de l'activité des cellules de Sertoli, qui sont les cellules de soutien de la spermatogenèse dans le testicule) et les hormones liées à la fonction thyroïdiennes. Les hommes inclus étaient âgés de 18 à 55 ans, sans vasectomie, consultant au laboratoire d'andrologie du *Massachusetts General Hospital* (Boston). Le taux de participation approximatif des sujets éligibles approchés était de 65 %, et 167 hommes ont pu être recrutés. La concentration de bisphénol A a été estimée à partir de prélèvements urinaires réalisés le même jour que les prélèvements de sérum ayant permis les dosages hormonaux. La concentration urinaire de bisphénol A était associée à une augmentation du taux plasmatique de FSH (contrairement à l'étude de Hanaoka et coll., 2002), à une diminution du taux d'inhibine B et du ratio œstradiol/testostérone (considéré comme un marqueur de l'activité aromatasase), ainsi qu'à une augmentation du ratio FSH/inhibine B (considéré comme un marqueur de l'activité des cellules de Sertoli). De façon statistiquement non significative, le taux de LH avait tendance à augmenter avec l'exposition ($p=0.07$). Le taux de bisphénol A n'était pas associé aux concentrations d'hormones thyroïdiennes (TSH, triiodothyronine T3, tétraïodothyronine T4).

Pour 75 hommes, des prélèvements urinaires ayant permis des dosages supplémentaires du bisphénol A ont été réalisés dans la période suivant le jour du prélèvement sanguin lors duquel le dosage hormonal a été fait ; l'objectif de ces dosages supplémentaires était d'améliorer l'estimation de l'exposition en utilisant la moyenne de plusieurs dosages plutôt qu'un unique dosage du BPA. La pertinence de l'approche utilisée est discutable, dans la mesure où la taille de l'échantillon était bien plus faible que dans l'analyse principale, et où les dosages supplémentaires de BPA ont eu lieu ultérieurement aux dosages hormonaux. Les analyses statistiques ont été répétées, en prenant cette fois en compte la moyenne géométrique des dosages de bisphénol A successifs. Dans ce sous-groupe, les paramètres caractérisant les associations entre bisphénol A et dosages hormonaux étaient très similaires qu'on estime la dose de bisphénol A à partir du premier dosage ou des dosages successifs. Les dosages additionnels de bisphénol A ayant été réalisés après le dosage des hormones plasmatiques, cette nouvelle analyse présente un intérêt limité et doit être interprétée avec prudence, d'autant que le nombre de sujets était bien plus faible que dans l'analyse principale. Elle n'apportait donc pas réellement d'information supplémentaire par rapport aux résultats rapportés plus haut.

La principale limitation de ces deux études est leur approche transversale, consistant en un dosage simultané des niveaux de bisphénol A et des paramètres hormonaux d'intérêt. Un tel protocole ne permet pas d'estimer l'imprégnation au bisphénol A dans la fenêtre de temps biologiquement pertinente qui, si elle n'est pas connue avec précision, est nécessairement antérieure à la période du dosage hormonal ; selon que cette fenêtre est située quelques jours, quelques mois ou années avant le moment où les paramètres hormonaux sont dosés, le niveau de bisphénol A le jour du dosage hormonal représentera plus ou moins bien la dose dans la fenêtre d'exposition biologiquement pertinente. Ce protocole ne permet pas non plus d'écarter un biais de causalité inverse, qui pourrait survenir si le statut hormonal était associé à une modification du métabolisme du bisphénol A, ce qui serait susceptible d'entraîner une association statistique entre dosages hormonaux et concentration urinaire de bisphénol A dans laquelle les variations des concentrations hormonales seraient la cause et non pas la conséquence de l'exposition au bisphénol A. Un protocole plus satisfaisant pour documenter les effets à court terme de polluants ayant une demi-vie dans l'organisme courte

(Bonde, et coll., 1996) consisterait à réaliser des dosages urinaires répétés de bisphénol A, suivis d'un ou plusieurs dosages hormonaux, et de mettre en relation les niveaux de bisphénol A (moyennés sur une certaine fenêtre temporelle) avec le statut hormonal ultérieur. Toutefois, il faut noter que ce protocole assez lourd à mettre en œuvre est jusqu'ici très rare dans la littérature, en particulier lors des premières études réalisées sur un contaminant.

Dysfonction sexuelle

L'étude rétrospective (Li et coll., 2010a) a consisté à identifier une usine produisant du bisphénol A et trois usines en utilisant (usines dites exposées), à chercher à y recruter tous les travailleurs masculins exposés au bisphénol A, et à estimer par questionnaire la fréquence de certains troubles de la fonction sexuelle, déclarés lors d'un entretien en face-à-face standardisé. La fréquence de ces troubles a été comparée à celle observée selon une même approche dans une population témoin constituée de travailleurs d'usines n'utilisant pas de bisphénol A, et de conjoints masculins de femmes non exposées recrutées dans ces usines pour une étude ancillaire portant sur la santé de la femme. Le taux de participation des 373 travailleurs potentiellement exposés éligibles était de 62 %, d'où 46 travailleurs à la retraite ont été exclus ; parmi les travailleurs participant, 20 travailleurs (9,2 % des travailleurs exposés acceptant de participer) ont été exclus car ils n'ont pas répondu aux questions sur la vie sexuelle, d'après les auteurs bien souvent du fait d'une absence d'activité sexuelle récente. Parmi les travailleurs des usines n'utilisant pas de bisphénol A, le taux de participation des travailleurs éligibles était de 55 % ; ce groupe a été augmenté d'un groupe de 120 conjoints de femmes travaillant dans les usines non exposées (taux de participation non mentionné). Parmi ces travailleurs non exposés participant, 18 (4,4 % des sujets non exposés participant) ont été exclus du fait d'une absence de réponse aux questions sur l'activité sexuelle, ce qui correspond à un taux inférieur de moitié à celui constaté parmi les travailleurs exposés. Au final, 164 travailleurs potentiellement exposés et 386 travailleurs n'utilisant pas de bisphénol A ont participé.

La proportion d'hommes rapportant une difficulté à obtenir une érection était de 15,5 % chez les travailleurs considérés exposés, contre 4,4 % chez les travailleurs considérés non exposés, ce qui correspondait à un *odds-ratio* de trouble de l'érection de 3,9 après ajustement (intervalle de confiance à 95 %, 1,8 à 8,5). Une augmentation nette statistiquement et d'amplitude élevée était également observée pour toutes les autres caractéristiques de la vie sexuelle étudiées en relation avec l'exposition au bisphénol A (tableau I). Ces associations se maintenaient après exclusion des sujets déclarant avoir été exposés à d'autres produits chimiques ou à des métaux lourds à un moment quelconque de leur vie professionnelle, exposition quatre fois plus fréquente chez les travailleurs du groupe exposé au bisphénol A. L'association entre ces autres expositions et les caractéristiques de la vie sexuelle n'a pas été décrite.

En outre, les auteurs ont quantifié les niveaux de bisphénol A dans l'air de certains ateliers des usines produisant ou utilisant du bisphénol A, ainsi que les concentrations urinaires chez un sous échantillon des travailleurs considérés exposés (n=123) et non exposés (n=254). Ces dosages ont confirmé qu'en médiane, les travailleurs du groupe considéré exposé étaient effectivement davantage exposés (dose médiane, 58 µg/g créatinine, 25-75^e centiles, 13-467) que les travailleurs du groupe considéré non exposé (dose médiane, 1 µg/g créatinine, 25-75^e centiles, 0-11). Les dosages dans l'air ont permis de construire un indice d'exposition (combinant les niveaux de bisphénol A mesurés dans chaque atelier au nombre d'années passé par chaque travailleur dans l'atelier). Dans des analyses prenant en compte cet indice (en choisissant toujours le groupe des travailleurs des usines n'utilisant pas de bisphénol A

comme référence), les auteurs ont décrit l'évolution des *odds-ratios* de troubles de la vie sexuelle entre le groupe non exposé et les 3 tertiles d'exposition au bisphénol A. Une association dose-réponse monotone a été observée entre niveau croissant d'exposition cumulée au BPA et risque de dysfonction sexuelle.

On notera que, si l'objectif précis de l'étude n'avait pas été indiqué aux ouvriers lors du lancement de ce travail, on peut s'attendre à ce que cet objectif ait été connu dès que les premiers ouvriers ont répondu au questionnaire ; de plus, les entretiens ne se faisaient probablement pas à l'aveugle du statut du travailleur vis-à-vis de l'exposition, cette exposition étant totalement définie par la connaissance de l'usine, où les entretiens ont apparemment eu lieu. Ceci a pu avoir une influence sur la fréquence des troubles de la fonction sexuelle estimée dans les usines utilisant et n'utilisant pas de bisphénol A. Cette limite ne s'applique pas à l'analyse restreinte aux travailleurs non exposés (Li et coll., 2009). L'écart très important dans la fréquence des troubles de la vie sexuelle entre les sujets exposés et non exposés mérite d'être noté, et pourrait être attribué à un biais (par exemple celui mentionné ci-dessus) et/ou à un effet très important de l'exposition au bisphénol A (environ 50 fois plus élevée parmi les travailleurs exposés qu'en population générale) et des expositions corrélées au bisphénol A et non prises en compte dans l'étude. On peut également évoquer un biais potentiel lié au choix des valeurs seuils des événements de la vie sexuelle estimés à partir d'une échelle, choix dont le principe n'a pas été explicité.

Dans une seconde publication (Li et coll., 2010b), les auteurs ont réalisé des analyses complémentaires dans un sous-groupe des sujets inclus dans la première étude. Cette nouvelle publication est limitée à 427 travailleurs de la première étude chez qui un dosage de BPA a été réalisé dans les urines (à partir d'un échantillon dont le calendrier de prélèvement par rapport au moment de l'entretien sur la fonction sexuelle n'est pas indiqué). Cette analyse, qui n'est pas indépendante de la précédente, retrouve une association entre exposition au BPA (cette fois estimée sur une échelle quantitative) et la dysfonction sexuelle. L'apport principal de cette nouvelle publication est de proposer une analyse restreinte aux 253 sujets ne travaillant pas à un poste auquel ils étaient exposés au BPA. La dose médiane de BPA dans cette population était de 1,2 µg/g créatinine (25-75^e percentiles, 0 à 11,4 µg/g créatinine), contre 53,7 µg/g créatinine chez les travailleurs exposés (25-75^e percentiles, 8,6 à 558,9 µg/g créatinine). Les doses internes de BPA chez les travailleurs non exposés étaient donc proches de celles généralement constatées en population générale. Dans le groupe de travailleurs non exposés, les coefficients quantifiant l'association entre le niveau urinaire de BPA et certains marqueurs de la fonction sexuelle (notamment le désir sexuel et la satisfaction générale avec sa vie sexuelle) étaient similaires à ceux rapportés pour l'ensemble des 427 travailleurs, bien que l'association soit statistiquement moins nette (en terme de p-valeur), avec un effectif plus réduit. Les auteurs indiquent que les résultats étaient sensibles aux observations extrêmes (« *outliers* »), sans préciser de quelle façon. Le principal intérêt de cette nouvelle étude (Li et coll., 2010b) par rapport à la précédente (Li et coll., 2010a) est lié au groupe de population étudiée, ie les travailleurs non exposés, qui permet de caractériser une population dont les niveaux d'exposition sont du même ordre de grandeur que ceux de la population générale, et de limiter le biais possible lié à la connaissance par l'enquêteur du statut des travailleurs vis-à-vis de l'exposition.

Effets sur la fonction de reproduction féminine

Quatre études conduites chez la femme sont rapportées (tableau II). Elles se sont intéressées respectivement aux taux d'hormone, à l'endométriase, au cancer du sein et à la survenue de fausses couches spontanées.

Hormones

Une étude rétrospective a porté sur un groupe de 19 femmes non obèses, 7 femmes obèses avec des cycles menstruels considérés normaux, 7 patientes souffrant d'hyperprolactinémie, 21 femmes souffrant d'aménorrhée d'origine hypothalamique et 19 femmes avec un syndrome des ovaires polykystiques, dont 6 étaient obèses (Takeuchi et coll., 2004). Le taux sérique de bisphénol A a été dosé et corrélé à des dosages hormonaux dans l'ensemble de la population. Une association était notamment retrouvée pour la testostérone totale et libre, l'androstènedione et le DHEAS (déhydroépiandrostérone).

Cette étude est difficile à interpréter, du fait notamment de son caractère rétrospectif, gênant dans le cas des pathologies considérées, et de l'absence d'information sur le plan d'échantillonnage (il s'agit apparemment d'un échantillon de population de convenance). La corrélation entre bisphénol A et paramètres hormonaux ne peut pas être interprétée, dans la mesure où les pathologies des sujets (toutes associées à des variations possibles du métabolisme ou du comportement alimentaire, source d'exposition au bisphénol A) n'ont pas été prises en compte.

Endométriose

Deux études se sont intéressées à la relation entre endométriose et taux de bisphénol. Une étude italienne portait sur 69 femmes fertiles consultant à l'hôpital de Naples, Italie pour troubles du cycle menstruel, kystes ovariens ou douleurs pelviennes chroniques (Cobellis et coll., 2009). Au sein de cette population, 58 femmes souffraient d'endométriose (cas), alors que 11 femmes n'avaient pas d'endométriose, et ont été comparées aux cas. Le taux de détection du bisphénol A dans le sang était très faible, ce qui est une limite de l'étude. Le taux de détection du bisphénol A était de 0% parmi les 11 « témoins », et de 52 % chez les cas. Le niveau de bisphénol A n'a pu être quantifié que pour environ 25 % des cas.

Antérieurement, une étude réalisée sur une population de 140 patientes japonaises choisies parmi 166 femmes se plaignant de stérilité (Itoh et coll., 2007) n'a pas trouvé de différence dans le taux urinaire de bisphénol A entre les femmes avec un diagnostic d'endométriose et celles sans endométriose. Ces deux études utilisent des technologies différentes pour doser le bisphénol et concernent des populations différentes. Comme pour l'étude sur les concentrations hormonales (Takeuchi et coll., 2004), le dosage rétrospectif du bisphénol A est particulièrement problématique, et ne permet pas de savoir si c'est le taux de bisphénol A qui est susceptible d'influencer la survenue d'endométriose, ou le contraire. Dans l'ensemble, ces études rétrospectives en milieu clinique sont méthodologiquement limitées (absence de plan d'échantillonnage, d'estimation du taux de participation, approche rétrospective...).

Cancer du sein

A notre connaissance, une seule étude épidémiologique a cherché à caractériser l'influence de l'exposition au BPA sur le risque de cancer du sein chez l'humain (Yang et coll., 2009). L'étude était de type cas-témoins, et a porté sur 82 femmes chez qui un cancer du sein a été diagnostiqué (entre 1994 et 1997) à l'hôpital national universitaire de Séoul (Corée du Sud), et 70 femmes témoins appariées sur l'âge et recrutées dans le même hôpital, où elles consultaient du fait d'inquiétudes concernant le cancer du sein, mais chez qui la pathologie n'a finalement pas été diagnostiquée. Le BPA n'était détectable dans le sang que d'environ 51 % des sujets (différence éventuelle entre cas et témoins non indiquée). Il n'y avait pas de différence nette dans le taux de BPA entre les cas (médiane, 0,61 µg/l) et les témoins (médiane, 0,03 µg/l, test de Wilcoxon, p=0,42). La limite importante de cette étude est que le prélèvement ayant permis le dosage du BPA a été fait après le diagnostic du cancer du sein,

et qu'il s'agit d'un unique prélèvement, ne permettant pas d'estimer l'exposition moyenne, dans une fenêtre d'exposition cohérente avec celle suggérée dans l'expérimentation animale (exposition fœtale ou périnatale). Le fait de prélever le sang après le diagnostic ne permet pas d'exclure que le taux de BPA est influencé par le statut des sujets vis-à-vis de la maladie (modification des taux de BPA du fait des traitements, de changements de comportement, ou de modifications physiologiques induites par la maladie). Par ailleurs, l'effectif considéré est modeste, et la proportion élevée de valeurs non détectées diminue l'aptitude de l'étude à caractériser efficacement l'impact du BPA sur le cancer du sein.

Effets sur la survie fœtale /survenue de fausse-couche spontanée

Sugiura-Ogasawara et coll. (2005) ont dosé le bisphénol A dans le sérum de femmes de Nagoya (Japon) ayant un antécédent d'au moins 3 fausses couches spontanées (45 femmes), ainsi que chez 32 femmes n'ayant jamais accouché et n'ayant pas d'antécédent d'infécondité. Les taux de bisphénol A étaient plus élevés chez les femmes ayant un antécédent de 3 fausses couches spontanées. Les auteurs ont aussi réalisé un suivi prospectif de l'ensemble de ces femmes, chez qui 35 grossesses ont été observées, dont 17 fausses couches spontanées. Les femmes ayant eu une fausse couche spontanée au cours du suivi avaient un taux de bisphénol A plus élevé que celles ayant eu une naissance vivante, sans que la différence soit statistiquement significative d'après les auteurs.

Cette étude est difficile à interpréter du fait de l'approche rétrospective, et du choix d'un groupe de comparaison qui semble peu adapté. Un groupe de femmes ayant obtenu une naissance vivante aurait permis de discuter si le niveau de bisphénol A différait selon l'issue de la grossesse ; une mesure de l'exposition avant la survenue de la grossesse plutôt qu'après aurait permis d'éliminer un biais de causalité inverse, qui pourrait créer une différence dans le taux de bisphénol A entre les groupes comparés si le fait d'avoir une grossesse entraînait une modification du taux de bisphénol A (par exemple via une modification du métabolisme, des comportements, notamment alimentaires, de la corpulence...). La partie prospective de l'étude est elle aussi difficile à interpréter du fait de la modalité de sélection de l'échantillon. Cette étude, prise isolément, peut donc être considérée comme étant très peu informative sur l'association entre exposition au bisphénol A et risque de fausse couche spontanée.

Autres effets potentiels du bisphénol A n'entrant pas dans le champ de l'expertise

On peut noter qu'un petit nombre d'études chez l'Homme ont cherché à caractériser l'impact potentiel de l'exposition au bisphénol A sur d'autres événements de santé n'entrant pas dans le champ de cette expertise, et notamment le stress oxydatif et des marqueurs d'inflammation (Yang et coll., 2009), la croissance fœtale (Wolff, et coll., 2008), le comportement de l'enfant (Braun, et coll., 2009 ; Longnecker, 2009), la survenue de diabète et la fonction hépatique (Lang et coll., 2008).

En conclusion, dans l'ensemble, les études épidémiologiques sont trop peu nombreuses pour déterminer la plausibilité chez l'homme des effets observés dans l'expérimentation animale. A l'heure actuelle, les études réalisées chez la femme concernant le risque de cancer du sein ou d'endométriose reposent toutes sur une approche rétrospective (particulièrement limitée pour un composé non persistant comme le bisphénol A) et des populations cliniques de convenance, sans plan d'échantillonnage précis. Du côté masculin, une étude en Chine

suggère une association entre exposition professionnelle au BPA et troubles de la fonction sexuelle, et une étude transversale réalisée auprès d'hommes consultant auprès d'une clinique d'infertilité du Massachusetts rapporte une association entre niveaux de BPA urinaires et hormones sexuelles. La confirmation ou l'infirmité de la plausibilité de retrouver chez l'homme certains des effets mis en évidence dans l'expérimentation animale impliquerait la réalisation d'études avec un suivi régulier des expositions chez la femme enceinte puis un suivi sanitaire de sa descendance, longues et lourdes méthodologiquement, auprès de populations de taille importante.

Tableau 1 : Etudes concernant les effets possibles de l'exposition masculine humaine au bisphénol A ou BADGE sur des paramètres de fertilité

Etude	Population	Exposition			Paramètres de santé ^a	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Co-expositions		
Fonction hormonale						
Hanaoka et coll., 2002 Aichi (Japon)	42 travailleurs exposés - affectation à un poste où le BADGE est utilisé - 42 travailleurs non exposés	Dosage urinaire de bisphénol A (prélèvement urinaire et plasmatique le même jour)	médiane [min-max] : Exposés : 1,1 [<LOD-11] µg/mol créatinine Non exposés : 0,5 [<LOD -11] µg/mol créatinine	Solvants organiques	Dosage plasmatique de LH, FSH, T libre	↓ de la FSH (p=0,05) chez les exposés par rapport aux non exposés ; Pas de différence nette de LH (p=0,65) , T libre (p=0,17) ; après ajustement sur l'âge et la consommation d'alcool
Meeker et coll., 2010 Massachusetts (USA)	167 patients masculins consultant pour infertilité	Dosage urinaire (prélèvement urinaire et plasmatique le même jour)	médiane et moyenne géométrique [25 ^e --75 ^e percentiles] : 1,3 [0,7-2,4] µg /l de BPA	Non décrites.	Dosage plasmatique LH, FSH, I B, FSH/Inhibine B, T, T libre, SHBG, FAI, T/LH, E2, E2/T, proline, T4 libre, T3 totale, TSH	↑ de FSH, FSH/ Inhibine B et E2/T ↓ de Inhibine B
Fonction érectile						
Li et coll., 2010a 4 régions (Chine)	164 travailleurs exposés - travailleurs de 4 usines produisant ou utilisant du bisphénol A. 386 travailleurs non exposés : travailleurs n'utilisant pas de bisphénol A, ou certains maris non-exposés de femmes	Intitulé du poste de travail (matrice emploi exposition)	50 ^e percentile [25 ^e -75 ^e percentiles] Exposés : 58 [13-467] µg/g créatinine Non-exposés : 1 [0-11] µg/g créatinine	Autres polluants chimiques, métaux lourds (13 % des sujets non exposés, 59 % des exposés)	Questionnaires sur dysfonction érectile, dysfonction orgasmique, désir sexuel, satisfaction vis-à-vis de la vie sexuelle.	Odds-ratios (OR) associés à l'exposition : OR=3,9 (IC 95 % : 1,8-8,5) pour l'aptitude à obtenir une érection >50 % des rapports ; OR=7,1 (2,9-17,6) pour le fait de rapporter des difficultés à éjaculer ; OR=3,9 (2,3-6,6) pour un niveau de satisfaction vis-à-vis de la vie sexuelle inférieur à 10 (sur une

	travailleuses non-exposées.					échelle de 0 à 10) Résultats globalement inchangés après exclusion des hommes déclarant être exposés aux autres polluants chimiques et métaux lourds.
Li et coll., 2010b	427 travailleurs : 174 exposés et 253 non exposés	Dosage urinaire du bisphénol	idem	idem	Questionnaires sur dysfonction érectile, dysfonction orgasmique, désir sexuel, satisfaction vis-à-vis de la vie sexuelle.	Association entre le taux de bisphénol urinaire et l'ensemble des dysfonctions sexuelles étudiées chez les travailleurs non exposés Effet dose réponse pour 6 des 7 paramètres étudiés

a : E2 : œstrogène ; FAI : *Free androgen index*, correspondant au ratio entre la concentration totale de testostérone et la concentration de SHBG ; FSH : hormone folliculo-stimuline ; LH : hormone lutéinisante ; SHBG : *Sex hormone binding globulin*, T : testostérone, T4 , T3 , TSH : Hormone thyroïdo-stimuline.

Tableau 2 : Etudes concernant les effets possibles de l'exposition féminine humaine au bisphénol A sur des paramètres de fertilité

Etude	Population	Exposition		Paramètres de santé ^a	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Estimation	
Fonction hormonale					
Takeuchi et coll., 2004 Tokyo (Japon)	19 femmes non obèses 7 femmes obèses avec des cycles menstruels normaux : 7 patientes souffrant d'hyperprolactinémie (Hyper-pro), 21 femmes souffrant d'aménorrhée d'origine hypothalamique (HA) et 19 femmes avec un syndrome des ovaires polykystiques (SOP), dont 6 obèses	Dosage sérique de bisphénol A	Non obèses : 0,71 ± 0,09 Obèses : 1,04 ± 0,09 (p<0,05) Hyper-pro : 0,83 ± 0,12 (ns) HA : 0,84 ± 0,10 (ns) SOP (non obèses) : 1,05 ± 0,10 (p<0,05) SOP (obèses) : 1,17 ± 0,16 (p<0,05)	Dosage sérique de LH, FSH, E2, T totale, T libre, A, DHEAS, prolactine, Insuline ; Mesure de l'IMC	Association entre le taux sérique de bisphénol de l'ensemble de la population et la T totale, T libre, A et DHEAS Etude difficile à interpréter car les facteurs de confusion propres à chaque pathologie n'ont pas été pris en compte et absences d'information sur l'échantillonnage de la population
Endométriose					
Cobellis et coll., 2009 Naples (Italie)	Sur 69 femmes fertiles en consultation à l'hôpital 58 femmes souffrant d'endométriose 11 femmes non atteintes	Dosage sérique de Bisphénol A	Détection de bisphénol chez 52% des cas Aucune détection de bisphénol chez les témoins	Endométriose	Etude difficile à interpréter car les taux de détection du bisphénol dans le sang sont faibles
Itoh et coll., 2007 Tokyo (Japon)	Sur 166 femmes infertiles consultant à l'hôpital 140 femmes avec un diagnostic d'endométriose	Dosage urinaire de bisphénol	médiane [25 ^e - 75 ^e percentiles] Grade 0-IV : 0,80 [0,45-1,3] µg/g créatinine Grade 0-I : 0,74 [0,45-1,21] µg/g créatinine (ns)	Endométriose avec détermination du grade de sévérité (0 à IV)	Pas d'association entre le taux de bisphénol urinaire et l'endométriose Etude difficile à interpréter difficile car elle comporte des limites méthodologiques (discussion dans le

			Grade II-IV : 0,93 [0,5- 01,48] µg/g créatinine (ns)		texte)
Cancer du sein					
Yang et coll., 2009 Séoul (Corée su Sud)	82 femmes avec un cancer du sein diagnostiqué 70 femmes consultant dans le même hopital	Dosage sérique du bisphénol	médiane Cas : 0,61 µg/l (test de Wilcoxon, p=0,42) Témoins : 0,03 µg/l créatinine	Cancer du sein	Pas d'association entre taux de bisphénol et survenue de cancer du sein Etude difficile à interpréter car elle comporte des limites méthodologiques (discussion dans le texte)
Survenue de fausses- couches					
Sugiura-Ogasawara et coll., 2005 Nagoya (Japon)	45 femmes ayant eu au moins trois fausses couches spontanées 32 femmes n'ayant jamais accouché et sans antécédent d'infécondité	Dosage sérique du bisphénol	moyenne ± SD Cas : 2,59 ± 5,23 µg/l (p=0,024) Témoins : 0,77 ± 0,38 µg/l	Grossesses ; Fausses couches spontanées	Pas d'association significative entre taux élevé de bisphénol et la survenue d'une fausse couche selon les auteurs Etude difficile à interpréter car elle comporte des limites méthodologiques (discussion dans le texte)

a : A : androstènedione ; DHEAS : déhydroépiandrostérone ; E2 : œstrogène ; IMC : Indice de masse corporelle ; FSH : hormone folliculo-stimuline ; LH : hormone lutéinisante ; SHBG : *Sex hormone binding globulin*, T : testostérone, TSH : Hormone thyroïdo-stimuline.

BIBLIOGRAPHIE

- BONDE J, GIWERCMAN A, ERNST, E. Identifying environmental risk to male reproductive function by occupational sperm studies : logistics and design options. *Occup Environ Med* 1996, **53** : 511-519
- BRAUN J, YOLTON K, DIETRICH K, HORNUNG R, YE X, CALAFAT A, LANPHEAR B. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1945-1952
- COBELLIS L, COLACURCI N, TRABUCCO E, CARPENTIERO C, GRUMETTO L. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomed Chromato.* 2009, **23** : 1186-1190
- HANAOKA T, KAWAMURA N, HARA K, TSUGANE S. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* 2002, **59** : 625-628
- ITOH H, IWASAKI M, HANAOKA T, SASAKI H, TANAKA T, et coll. Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis: A cross-sectional study. *Environ Health Prev Med* 2007, **12** : 258-264
- LANG IA, GALLOWAY TS, SCARLETT A, HENLEY WE, DEPLEDGE M, et coll. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 2008, **300** : 1303-1310
- LI D, ZHOU Z, QING D, HE Y, WU T et coll. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of Self-Reported Male Sexual Dysfunction. *Hum Reprod* 2010a, **25** :519-527
- LI DK, ZHOU Z, MIAO M, HE Y, QING D et coll. Relationship between Urine Bisphenol-A (BPA) Level and Declining Male Sexual Function. *J Androl* 2010b May 13. [Epub ahead of print]
- LONGNECKER M. Human Data on Bisphenol A and Neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 531-532
- MEEKER JD, CALAFAT AM, HAUSER R. Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic. *Environ Sci Technol* 2010, **44** : 1458-1463
- SUGIURA-OGASAWARA M, OZAKI Y, SONTA S, MAKINO T, SUZUMORI K. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2005, **20** : 2325-2329
- TAKEUCHI T, TSUTSUMI O, IKEZUKI Y, TAKAI Y, TAKETANI Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004, **51** : 165-169
- WOLFF M, ENGEL S, BERKOWITZ G, YE X, SILVA M, ZHU C, WETMUR J, CALAFAT A. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1092-1097
- YANG M, RYU JH, JEON R, KANG D, YOO KY. Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors. *Arch Toxicol* 2009, **83** : 281-285

3

Etudes récentes chez les animaux mâles

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été effectuées chez le rongeur avec essentiellement des expositions à doses faibles par voie orale. Parmi les études *in vivo* chez le rongeur, la plupart se concentrent sur l'exposition au cours de la gestation et lactation plus rarement sur la période péripubertaire ou adulte.

Les études prises en considération sont celles qui ont été réalisées avec des doses de BPA inférieures à la NOAEL de 5 000 µg/kg/jour. En effet, seules ces études peuvent être comparées avec l'exposition humaine.

Exposition continue et chronique au travers de toutes les étapes du développement

Dans les deux études de Tyl et coll. (2002, 2008), les rongeurs sont exposés par gavage à une gamme de concentrations allant de 3 µg/kg/j à 600 000 µg/kg/j chez la souris, et de 1 µg à 500 000 µg chez le rat ; un groupe témoin positif reçoit par voie orale du 17 beta œstradiol. Les parents (F0) sont exposés 8 semaines avant l'accouplement, le nombre initial d'animaux/groupe répond à l'objectif d'avoir au moins 20 femelles gravides par groupe. Il s'agit d'une exposition continue dans les deux sexes, les croisements aux générations successives sont faits avec des animaux mâles et femelles exposés pareillement. Ces deux études répondent aux critères de bonnes pratiques de laboratoires (BPL) définies par l'OCDE pour les essais de substances chimiques.

La conclusion générale des deux études de Tyl et coll. est que le BPA dans la large gamme de doses étudiée, et plus particulièrement aux doses compatibles avec l'exposition humaine, n'a pas d'effet sur la reproduction. On note toutefois des effets aux plus fortes doses (non pertinentes pour l'exposition humaine).

Il est à noter que les poids d'organe rapportés sont les poids bruts et non relatifs, que l'évaluation de la morphologie spermatique normale et anormale est subjective (méthode manuelle). Enfin, dans les deux études, les animaux sont alimentés avec un régime non dépourvu de phytoestrogènes.

Exposition pendant la période de gestation et de lactation

Quelques études récentes sont référencées pour l'analyse de l'exposition pendant cette période. Trois études sont effectuées chez le rat mais sur des souches différentes et par gavage et deux études sont réalisées chez la souris CD-1, l'une par implant et l'autre par gavage.

Salian et coll. (2009a) utilisent la souche de rat Holtzmann. Les doses de BPA (1,2 et 2,4 µg/kg/j) sont compatibles avec les expositions humaines. L'exposition va du 12^e jour de gestation à 21 jours après la naissance des F1. Le régime est dépourvu de phytoestrogènes. Le

Diéthylstilbestrol (DES) sert de contrôle positif. Les rats jeunes adultes 75 jours après la naissance sont croisés avec des femelles contrôles. Les mâles non exposés en F2 et F3 sont étudiés. A la génération F1, les auteurs observent une augmentation significative des pertes post-implantatoires (moins importantes que pour le DES), une diminution de la taille des portées, du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes (détermination visuelle pour les 2, dans un hémocytomètre). On note un délai significativement augmenté pour la copulation en F1. Les taux d'hormones adultes (FSH, LH, testostérone, œstradiol) sont significativement diminués (particulièrement les taux d'œstradiol). Une réduction du profil d'expression de ER beta et de AR (maximum pour ce dernier au stade VIII - androgéno-dépendant -de la spermatogenèse) au niveau testiculaire dans les 3 générations, a été observée. Le profil d'expression de ER alpha est au contraire augmenté, seulement en première génération. Ces effets sont retrouvés dans les générations suivantes non exposées issues de F1 exposées. Les auteurs concluent qu'une exposition pendant la gestation et la lactation à des doses de BPA pertinentes pour l'homme influent sur la lignée germinale mâle, conduisant à des déficiences dans la fertilité des F1 et de leurs descendants mâles même non exposés.

L'effet maintenu dans les générations suivantes (F2, F3) évoque une reprogrammation de la lignée germinale par des mécanismes (génétiques/épigénétiques) persistant au-delà de l'exposition initiale.

Chez le rat Long-Evans mâle, Howdeshell et coll. (2008) n'ont pas observé de modification de différents paramètres de reproduction et des niveaux d'hormones, après exposition avec des doses orales relativement faibles d'éthynylœstradiol (EE) de 0,05 à 1,5 µg/kg/j ou de BPA de 2, 20, 200 µg/kg/j. Les mères ont été gavées du 7^e jour de gestation à 18 jours après la naissance. La distance ano-génitale a été mesurée 2 jours après la naissance et la rétention des mamelons 14 jours après la naissance chez les petits mâles. La nécropsie a été effectuée 150 jours après la naissance. Le poids (relatif) des vésicules séminales avait tendance à être diminué avec une exposition au BPA à 20 µg/kg/j, les poids épидидymaires avec le BPA à 2 et 20 µg/kg/j, de même que le nombre de spermatozoïdes. Il faut noter enfin que l'alimentation contenait des phytoestrogènes.

Dans l'étude plus ancienne de Watanabe et coll. (2003), les doses utilisées sont beaucoup plus fortes. Les rates gravides (Sprague Dawley) ont été exposées au BPA par gavage avec 4 000 µg, 40 000 µg et 400 000 µg/kg du 6^e jour de gestation au 20^e jour après la naissance. Les concentrations de testostérone plasmatique chez les rats postpubères (63 jours après la naissance) étaient significativement augmentées dans les groupes BPA. À l'âge de 36 semaines, les concentrations hormonales avaient tendance à être augmentées selon une relation dose réponse monotone. On observe une tendance similaire pour les taux de testostérone testiculaire. Le taux d'œstradiol n'est pas modifié. Il n'y a pas d'altération des poids des testicules. Il n'y a aucun changement notable des concentrations plasmatiques de la LH et de la FSH. Les résultats suggèrent que l'exposition au BPA (à ces doses élevées) au cours de la période gestationnelle et de lactation a un effet significatif sur l'homéostasie de la testostérone chez les mâles. Le fait que la testostérone soit augmentée et pas l'œstradiol peut suggérer une éventuelle modification de l'activité aromatasase.

Chez la souris, Okada et coll. (2008) ont évalué l'effet du BPA (comparé au 17βŒstradiol) administré chroniquement avec des implants (dose totale dans le tube : 100 µg ou 5 000 µg) placés 3 jours avant le croisement avec des souris mâles. Le tube a été maintenu pendant toute la période gestationnelle et lactationnelle et la nécropsie a eu lieu au 28^e jour après la naissance. Cette méthode évite la manipulation des animaux mais ne permet pas de comparaison avec une exposition orale. La plupart des souris ayant reçu le témoin positif avortaient. Le poids corporel et le poids des organes reproducteurs (testicules, épидидyme et glandes annexes) dans les groupes traités n'étaient pas modifiés. Le pourcentage de tubes

séminifères dans les testicules avec des spermatozoïdes matures est significativement plus faible pour le groupe 5 000 µg BPA. La testostérone tend à être augmentée dans le groupe 100 µg BPA.

D'autres auteurs (Kabuto et coll., 2004) ont étudié les modifications des capacités antioxydantes endogènes et des dommages oxydatifs dans le cerveau, le foie, les reins, les testicules chez la souris exposée au BPA (5 ou 10 µg BPA/ml d'eau de boisson) une semaine avant croisement puis du premier jour de gestation au 28^e jour après la naissance, moment du sacrifice des petits. Le poids sec des testicules est significativement diminué avec la dose de 10 µg BPA/ml. L'exposition au BPA augmente l'activité de la catalase dans le foie et de la glutathion peroxydase dans les reins. Elle augmente également le taux d'acide thiobarbiturique dans le cerveau, les reins et les testicules. L'activité catalase dans le testicule est diminuée. Ces résultats suggèrent que l'exposition gestationnelle/lactationnelle au BPA chez la souris induit un stress oxydatif et une peroxydation des tissus, conduisant notamment à une hypotrophie des testicules.

Exposition néonatale

Kato et coll. (2006) ont traité des rats mâles Sprague-Dawley du jour de la naissance au 9^e jour avec le BPA par voie sous-cutanée, comparativement au 17β-œstradiol (E2) utilisé de la même manière, selon les catégories de poids de nouveau-nés. Les doses utilisées allaient de 2 µg/kg à 97 000 µg/kg en fonction de catégories de poids des rats nouveau-nés. Les nécropsies sont faites au 10^e, 35^e et 150^e jour après la naissance. La séparation du prépuce, le taux de copulation, le taux de fécondité, l'analyse du sperme, le taux de testostérone sérique et l'expression des gènes (expression de ER et AR, et gènes impliqués dans les voies de synthèse des hormones stéroïdes) dans les testicules ont été évalués. Seuls les animaux du groupe E2 ont des paramètres modifiés. En revanche, l'exposition au BPA n'entraînait pas d'anomalies des paramètres reproductifs ni des taux d'hormones. Il n'y a pas de modifications de l'expression des gènes dans le testicule, quelle que soit la dose de BPA.

Salian et coll. (2009b) ont analysé les mécanismes d'action du BPA sur le testicule chez le rat. Des rats mâles (Holtzmann) sont exposés par injection sous cutanée au BPA à des doses allant de 0,6 à 10 µg/rat (100-1 600 µg/kg de poids corporel de BPA un jour après la naissance jusqu'à 5 jours après. Le DES est utilisé comme contrôle positif. Le régime est dépourvu de phytoestrogènes. Le protocole général, les paramètres phénotypiques étudiés et la façon de les étudier est similaire à l'étude décrite précédemment (Salian et coll., 2009a). La fertilité est évaluée et la plus faible dose de BPA efficace pouvant altérer la fertilité est déterminée. Les auteurs rapportent une baisse significative de la production de spermatozoïdes, des déséquilibres hormonaux, un temps pour la copulation plus long chez les rats exposés. Les femelles accouplées aux mâles exposés à différentes concentrations de BPA ont une augmentation significative des pertes post-implantation et une diminution de la taille des portées. La dose de 2,4 µg/rat, correspondant à 400 µg/kg de BPA, est la dose la plus faible capable d'altérer la fertilité mâle. Par des études immunohistochimiques, une réduction significative de l'expression de connexines (Cx-43) (45^e et 90^e jour) et une augmentation de l'expression de la N-cadhérine (45^e et 90^e jour) et de la zona-occludin-1 (ZO-1) (90^e jour) (protéines constituant les jonctions adhérentes des cellules de Sertoli) ont été observées dans les testicules de rats exposés. De façon intéressante, une expression altérée de Cx43 est notée dans les cellules testiculaires desquamées des rats exposés, et non dans celles des contrôles. Ces perturbations pourraient être l'un des facteurs qui conduisent à des troubles de la spermatogenèse chez les animaux exposés.

Exposition pubertaire

L'hypothèse de l'effet du BPA lors d'une exposition pubertaire sur les hormones et le comportement de l'animal juvénile (37 jours après la naissance) ou adulte (105 jours après la naissance) a été testée par Della Seta et coll. (2006). Les rats (Sprague Dawley) sont exposés par voie orale en phase prépubertaire, du 23^e au 30^e jour après la naissance, à la dose de 40 µg/kg/j (témoin positif : éthinyloestradiol -EE- à 0,4 µg/kg/j). L'exposition à EE modifie le schéma temporel de l'activité sexuelle des mâles, réduisant les performances chez l'adulte. Des modifications dans la même direction, mais de manière moins marquée sont observées avec le BPA. Les concentrations de testostérone sont diminuées avec le BPA chez les animaux juvéniles. Cet effet persiste chez l'adulte de manière significative uniquement dans le groupe d'animaux exposé au BPA. Les taux d'œstradiol ne sont pas modifiés.

Exposition jeune adulte et adulte

Le BPA et l'octylphénol (OP) ont été comparés sur différents événements de la reproduction après une exposition post-pubertaire (52 jours après la naissance) chez le rat mâle Wistar par injection sous cutanée quotidienne (Herath et coll. 2004). Après 5 semaines de traitement (3 000 µg/kg), les taux de testostérone plasmatique et le nombre de spermatozoïdes épididymaires étaient significativement réduits avec BPA et OP. Les animaux exposés avaient des taux élevés de progestérone. La mobilité des spermatozoïdes n'était pas modifiée. Le BPA augmentait le poids de la prostate ventrale et il y avait des taux élevés de l'IGF-I. Les auteurs concluent que l'exposition du jeune adulte au BPA joue sur la production de spermatozoïdes. L'association de l'hypertrophie de la prostate ventrale avec l'IGF-I plasmatique fait évoquer un possible rôle des expositions au BPA dans les maladies de la prostate, car IGF-I est impliqué dans la pathogénie des cancers de la prostate chez l'homme.

Chitra et coll. (2003) ont évalué l'effet du bisphénol A sur le système antioxydant des spermatozoïdes épididymaires de rat (Wistar). Le BPA a été administré par voie orale à des doses de 0,2, 2 et 20 µg/kg par jour pendant 45 jours. On a observé une diminution significative du poids des testicules et épididymes, et une augmentation très importante de la prostate ventrale. Le BPA entraîne une diminution de la mobilité et du nombre de spermatozoïdes (évaluées à l'hémocytomètre,) de manière dose-dépendante. Les activités de la superoxyde dismutase, catalase, glutathion réductase et glutathion peroxydase étaient diminuées tandis que les niveaux de H₂O₂ et la peroxydation des lipides étaient augmentées. Ces résultats suggèrent qu'une exposition subchronique adulte au BPA provoque un épuisement des défenses anti-oxydantes, qui peut aboutir à un stress oxydatif des spermatozoïdes.

Ashby et coll. (2003) ont conduit 4 études indépendantes testant des doses de 20 µg/kg, 2 000 µg/kg et 200 000 µg/kg lors d'une exposition adulte au BPA chez le rat (Sprague-Dawley) de 91 à 97 jours après la naissance avec un sacrifice au 126^e jour. Les auteurs ne trouvent aucune modification significative de la production spermatique évaluée à l'hémocytomètre, contrairement aux changements dans la production spermatique rapportés dans une étude plus ancienne (Sakaue et coll., 2001) avec un protocole similaire.

En conclusion, plusieurs études récentes effectuées sur la seule période gestation/lactation et avec une exposition à des doses faibles mettent en évidence des effets sur la reproduction (modifications des taux d'hormone, du nombre et la qualité des spermatozoïdes, retard à la copulations...). Par ailleurs des effets retrouvés dans les générations suivantes non exposées

suggèrent une action sur la lignée germinale mâle, conduisant à des déficiences dans la fertilité des F1 et de leurs descendants mâles même non exposés.

Cependant, la pertinence de ces travaux pour prédire le danger pour l'homme chez lequel l'exposition est continue, reste relative.

BIBLIOGRAPHIE

ASHBY J, TINWELL H, LEFEVRE PA, JOINER R, HASEMAN J. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci* 2003, **74** : 129-138

CHITRA KC, LATCHOUMYCANDANE C, MATHUR PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*. 2003, **185** :119-27

DELLA SETA D, MINDER I, BELLONI V, ALOISI AM, DESSÌ-FULGHERI F, FARABOLLINI F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 2006, **50** :301-307

HERATH CB, JIN W, WATANABE G, ARAI K, SUZUKI AK, et coll. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 2004, **25** : 163-172

HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIG HT CR, WILSON VS, RYAN BC, et coll. Gestational and Lactational Exposure to Ethinyl Estradiol, but Not Bisphenol A, Decreases Androgen-Dependent Reproductive Organ Weights and Epididymal Sperm Abundance in the Male Long Evans Hooded Rat. *Toxicol Sci* 2008, **102** : 371-382

KABUTO H, AMAKAWA M, SHISHIBORI T. Exposure to Bisphenol A During Embryonic/Fetal Life and Infancy Increases Oxidative Injury and Causes Underdevelopment of the Brain and Testis in Mice. *Life Sci* 2004, **74** : 2931-2940

KATO H, FURUHASHI T, TANAKA M, KATSU Y, WATANABE H, et coll. Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod Toxicol* 2006, **22** : 20-29

OKADA A, KAI O. Effects of Estradiol-17beta and Bisphenol A Administered Chronically to Mice Throughout Pregnancy and Lactation on the Male Pups' Reproductive System. *Asian J Androl* 2008, **10** : 271-276

SAKAUE M, OHSAKO S, ISHIMURA R, KUROSAWA S, KUROHMARU M, et coll. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J Occup Health* 2001, **43** : 185-190

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Perinatal Exposure of Rats to Bisphenol A Affects the Fertility of Male Offspring. *Life Sci* 2009a, **85** :742-752

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Neonatal Exposure of Male Rats to Bisphenol A Impairs Fertility and Expression of Sertoli Cell Junctional Proteins in the Testis. *Toxicology* 2009b, **265** : 56-67

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD-1 (Swiss) Mice. *Toxicol Sci* 2008, **104** : 362-384

WATANABE S, WANG RS, MIYAGAWA M, KOBAYASHI K, SUDA M, et coll. Imbalance of Testosterone Level in Male Offspring of Rats Perinatally Exposed to Bisphenol A. *Ind Health* 2003, **41** : 338-341

4

Etudes récentes chez l'animal femelle

Le BPA et son conjugué (BPA-GA) sont capables de passer la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus au cours de la gestation (Nishikawa et coll., 2010). Des niveaux détectables de BPA ont été trouvés dans le placenta, le liquide amniotique et le fœtus (Moors et coll., 2006). Ces données ont fait naître l'idée que le BPA pouvait interférer avec les processus de développement de l'embryon et du fœtus et être responsable d'effets à long terme sur la reproduction du jeune ou de l'adulte.

Entre 2000 et 2005, des travaux ont montré que l'exposition pré et postnatale était associée à une variété d'anomalies de fonctionnement des tissus reproducteurs femelles telles que : l'ouverture précoce du vagin (Honma et coll., 2002), l'avancement de l'âge la puberté (Howdeshell et coll., 1999 ; Ryan, 2006), l'altération des cycles estriens (Markey et coll., 2003), la modification des niveaux plasmatiques de LH (*hormone lutéinisante*) (Rubin et coll., 2001), l'altération de l'histologie de l'utérus, du vagin (Schonfelder et coll., 2002, 2004, Markey et coll., 2005), de la glande mammaire (Markey et coll., 2001), ainsi qu'une modification de la morphologie ovarienne (Markey et coll., 2003). Les effets irréversibles sur la fertilité des femelles ont été observés chez plusieurs espèces/souches de mammifères comme les souris, les rats Sprague-Dawley (Kato et coll., 2003; Moral et coll., 2008), Wistar (Durando et coll., 2007 ; Ramos et coll., 2003), Fisher 344 (Khurana et coll., 2000) et le mouton (Evans et coll., 2004).

Au cours des dernières années, les expérimentations ont étudié plus spécifiquement les effets de faibles doses de BPA pendant des périodes critiques du développement de différents tissus et ont analysé les effets à long terme au moment de la puberté ou à l'âge adulte

Dans ce chapitre seront discutés les effets portant sur les modifications de la cyclicité et du comportement sexuel ; les altérations de l'appareil génital femelle (utérus, ovaire) ; l'induction d'une puberté précoce chez les rongeurs femelles. Une première partie présente les études qui ont privilégié la période d'exposition *in utero*, la deuxième partie abordant l'exposition néonatale. Les expositions à l'âge adulte ne sont pas abordées à ce stade de l'expertise.

Exposition de la période gestationnelle jusqu'au sevrage

Beaucoup d'études ont examiné les effets du BPA *in vivo* chez les rongeurs (souris et rat) au cours d'expositions prénatales (*in utero*) se poursuivant au cours de la lactation (de la naissance au sevrage).

Les études de Tinwell et coll. (2002), Tyl et coll. (2002 et 2008), réalisées selon l'approche réglementaires de Bonnes Pratiques de Laboratoire n'ont pas mis en évidence d'effets à la suite d'expositions au BPA au cours de la gestation se poursuivant au-delà. Notons que les paramètres mesurés sont essentiellement des poids d'organes et des analyses anatomo-histopathologiques associées à des comptages (nombre de follicules dans l'ovaire, de sites

d'implantation, de petits à la naissance). Aucun dosage hormonal n'a été effectué dans ces études.

Modification de la cyclicité et précocité sexuelle

Parmi les études sur rongeurs, Rubin et coll. (2001) ont montré que les descendantes femelles de rates Sprague-Dawley exposées pendant la gestation et la lactation à 1 200 µg/kg/j de BPA dans leur eau de boisson, présentent des cycles estriens perturbés (plus longs que la normale), une diminution de l'hypersécrétion de la LH en réponse à ovariectomie, suggérant un effet neuroendocrine. La perturbation des cycles chez l'adulte a également été rapportée chez les descendants femelles de rats Sprague-Dawley ayant reçu du BPA oralement (100 µg/kg/j) pendant leur gestation (du jour 6 à 21) (Richter et coll., 2007), ainsi que chez des souris CD-1 injectées avec 500 µg/kg/j de BPA des jours 15 à 18 de la gestation (Nikaido et coll. 2004).

La survenue de la puberté chez les rongeurs femelles peut être évaluée en observant l'âge auquel apparaît l'ouverture vaginale ou la première ovulation. Cette dernière peut être détectée en évaluant l'âge auquel l'épithélium vaginal devient corné, indiquant que la femelle est en chaleur (estrus). L'âge de la puberté est lié à la croissance postnatale, à la taille du corps et aux réserves énergétiques. Des pubertés précoces ont été observées chez la souris avec des expositions maternelles à des doses variant de 2,4 à 500 µg/kg/j dans plusieurs lignées de souris ICR/Jcl, CD-1, et CF-1 (Honma et coll., 2002 ; Nikaido et coll., 2004 ; Howdeshell et coll., 1999). Cependant, une étude récente (Ryan et coll., 2010) utilisant le rat Long-Evans comme modèle rapporte que l'exposition *in utero* (à partir du jour 7) et durant la lactation (jusqu'à 18 jours postnatales) au BPA (2, 20, 200 µg/kg/j) administré oralement aux mères n'a pas d'effet sur : l'âge de l'ouverture vaginale, la fertilité, le comportement sexuel (lordose) des femelles au moment de la puberté ou à l'âge adulte.

Si la plupart des études ont été menées chez les rongeurs, il existe également quelques travaux chez le mouton. Le traitement de brebis gestantes avec 5 000 µg/kg/j de BPA délivré par injection intra-musculaire entre les jours 30-60 de gestation montrent des niveaux de LH augmentés pendant les deux premiers mois de vie postnatale, et une diminution de l'amplitude de la décharge de LH à l'âge adulte. En revanche, l'âge d'apparition de la puberté n'est pas modifié (Savabieasfahani et coll., 2006). Des expériences conduites chez la brebis, via des injections intramusculaires de BPA (1 000 µg/kg/j) sur des animaux prépubères pendant 7 semaines avaient montré une diminution de la fréquence de la pulsativité de LH (Evans et coll., 2004).

Ces résultats montrent que l'exposition à des doses faibles de BPA au cours d'une période de temps critique pour le développement des organes neuroendocrines tels que l'hypothalamus et l'hypophyse altère les paramètres reproductifs chez les mammifères prépubères ou adultes. Ces altérations causent une maturation précoce de l'axe hypothalamo-hypophysaire et parfois une puberté précoce. La pulsativité du GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) se trouve modifiée chez les jeunes et les adultes, ce qui perturbe sévèrement la signalisation du GnRH dans l'hypophyse adulte.

Parmi les effets du BPA sur l'axe neuro-endocrine-gonade, citons ceux observés sur le comportement maternel chez la souris (Palanza et coll., 2002). Il a été montré que des souris femelles exposées au BPA (10 µg/kg/j) seulement pendant la gestation (du jour 14 au jour 18) ont des changements dans leur comportement maternel à l'âge adulte (Palanza et coll., 2002). Ces changements sont similaires à ceux observés dans le cas de traitement à l'âge adulte, consistant en un plus faible allaitement et une sortie plus fréquente du nid (Palanza et coll., 2002).

Altération de l'appareil génital femelle

Les études rapportent les effets sur l'utérus et le vagin ainsi que l'endothélium de l'endomètre.

Effets sur l'utérus et le vagin

Il existe plusieurs publications concernant l'effet du BPA sur le tractus génital femelle (utérus, vagin), que ce soit à la suite d'une exposition pendant la période gestationnelle/lactationnelle ou uniquement gestationnelle (Honma et coll., 2002, Markey et coll., 2003, 2005).

Le groupe d'Ana Soto a montré chez la souris CD-1 que des changements dans la morphologie ovarienne à 3 et 6 mois sont observés après exposition *in utero* ainsi que des altérations de l'utérus et du vagin chez les descendants femelles nés de mères traitées avec 0,025 et 0,25 µg/kg/j de BPA pendant 14 jours à partir du 9^e jour de gestation par injection via des pompes osmotiques (Markey et coll., 2005). Ces altérations comprennent une diminution du poids sec du vagin, une diminution du volume de l'endomètre et une expression plus importante des récepteurs ER alpha et de la progestérone dans l'épithélium de l'utérus.

Toujours chez la souris CD-1, Newbold et coll. (2009) ont étudié l'effet d'une exposition à 1, 10, 100 et 1 000 µg/kg/j de BPA pendant la gestation (de jour 9 à 16, définie comme la période d'organogenèse du tractus génital) en analysant l'histologie des ovaires et du tractus génital chez les animaux âgés de 18 mois. Le profil des lésions observées est le même que dans le cas d'une exposition postnatale à savoir une diminution du poids du vagin, du volume de l'endomètre, et une expression augmentée des récepteurs des œstrogènes (ERα) et de celui de la progestérone dans l'endomètre.

L'administration orale de 100 µg ou 50 000 µg/kg/j de BPA à des rats Sprague-Dawley femelles en gestation entraîne une diminution de l'expression protéique de ERbeta mesurée au cours du cycle. Une dose élevée de 200 µg/kg/j d'éthinylœstradiol (EE2) cause le même effet (Schönfelder et coll., 2004). L'ingestion par gavage du BPA (aux deux doses mentionnées ci-dessus) et de l'EE2 entraînent un changement important dans la morphologie du vagin au cours de l'œstrus : une diminution de l'épaisseur de la couche épithéliale (Schönfelder et coll., 2002).

Effet sur l'endothélium de l'endomètre

Deux études ont montré qu'une exposition pendant la période gestationnelle ou néonatale chez la souris au BPA augmente les anomalies morphologiques dans le tractus génital des femelles.

La première étude décrit l'apparition d'anomalies chez les femelles CD-1 âgées de 18 mois exposées au BPA (Newbold et coll., 2007). Cette étude rapporte que des doses de 10 à 1 000 µg/kg/j, pendant les 5 premiers jours de vie, augmentent le nombre de lésions bénignes (pré-néoplasiques) dans l'oviducte et que la dose de 100 µg/kg augmente significativement le nombre d'hyperplasies kystiques endométriales observées. Les auteurs observent également des lésions prolifératrices progressives (PPL) dans l'oviducte et des kystes mésonéphrétiques (restes des canaux de Wolff) dans tous les groupes exposés. Des pathologies plus sévères de l'utérus (leiomyoma, adenomyosis, polypes du stroma, hyperplasie atypique) sont également retrouvées. Cette étude montre donc un ensemble de modifications histologiques, de changements bénins, pré-malins et néoplasiques du tractus génital femelle (ovaires, utérus, oviducte) obtenus après exposition au BPA.

Des lésions semblables, de type hyperplasie kystique et atypique de l'endomètre, ont également été retrouvées dans une autre étude chez des femelles âgées de 3 mois et traitées au BPA (100 et 1 000 µg/kg/j) administré pendant toute la durée de la gestation et durant la vie néonatale (Signorile et coll., 2010).

Deux travaux montrent qu'un traitement au BPA durant la vie fœtale ou néonatale peut inhiber de manière permanente l'expression de gènes *Hox* dans l'utérus sur le rat Wistar (Varayoud et coll., 2008) et sur la souris CD-1 (Smith et coll., 2007). Les gènes *Hox* sont des morphogènes impliqués dans le développement et la différenciation de l'utérus et sont associés à la prolifération de l'endomètre. De nombreux xéno-œstrogènes peuvent altérer l'expression de ces gènes. Dans l'endomètre, les gènes *Hoxa10* et *Hoxa11* sont particulièrement importants pour la fertilité femelle, notamment pour permettre l'implantation (Cakmak et coll., 2010). Il a été démontré qu'une exposition pendant la période développementale au BPA réprime l'expression de *Hoxa10* dans l'endomètre adulte et que ceci est associé à un défaut de prolifération des cellules stromales en réponse aux hormones stéroïdes. Enfin d'autres travaux corroborent l'effet d'une exposition pendant la gestation sur le tractus génital femelle à l'âge adulte. A de faibles doses, le BPA induit une diminution du volume, une augmentation de la prolifération et une expression accrue des récepteurs aux œstrogènes ERalpha et à la progestérone dans l'endomètre utérin de souris adulte (Markey et coll., 2005). Des doses plus fortes induisent des effets semblables chez le rat (Schonfelder et coll., 2004). Les répercussions de ces changements sur la fertilité ou des pathologies endométriales restent à étudier.

Afin de déterminer si l'exposition *in utero* de BPA entraîne une altération de l'expression de *Hoxa10* dans l'utérus, des souris ont été traitées avec 500-5 000 µg/kg BPA, du jour 9 au jour 16 de gestation (Smith et coll., 2007). Une augmentation monotone de l'expression de *Hoxa10* dans les cellules stromales de l'utérus de souris âgées de 2 et 6 semaines a été observée lorsque celles-ci ont été exposées *in utero*. Les effets du BPA sur l'expression de *Hoxa10* persiste longtemps après l'exposition *in utero* et en absence de stimulation par les œstrogènes ce qui suggère l'existence de mécanismes épigénétiques qui maintiendraient l'expression altérée, en absence du ligand, ici le BPA.

Des expériences récentes menées chez la souris traitée du jour 1 de gestation jusqu'au jour 7 après la naissance avec du BPA (100 or 1 000 µg/kg/jour) montrent que les descendantes femelles après 3 mois, présentent des structures de type endométriose dans le tissu adipeux qui entoure le tractus génital. Ces structures présentent à la fois des glandes et du stroma exprimant le récepteur des œstrogènes et *Hoxa-10*. De plus, des ovaires kystiques, ainsi que de l'hyperplasie endométriale sont significativement plus fréquents chez les descendantes traitées en comparaison des contrôles. Bien que les doses soient élevées, il est intéressant de noter que l'on peut obtenir des phénotypes d'endométriose chez une espèce dans laquelle il n'existe pas de menstruations. Cette observation tendrait à montrer que l'endométriose est une maladie associée à une altération de développement des canaux de Müller pendant une période critique de l'embryogenèse suite à des changements de programmation génétiques ou épigénétiques (Signorile et coll., 2010)

En résumé, le mécanisme d'action par lequel l'exposition au BPA conduit à une pathologie endométriale reste à définir et nécessitera des travaux expérimentaux additionnels. Cependant des données solides démontrent nettement une altération des gènes cruciaux pour le fonctionnement de l'endomètre lors d'une exposition développementale chez les rongeurs. Ainsi, une exposition au BPA pendant la période *in utero* et périnatale pourrait altérer de manière permanente la programmation de l'utérus et sa réponse aux hormones stéroïdes à l'âge adulte.

Effets sur l'ovaire

Il a été montré que 5 et 70 µg/kg/j de BPA entraînaient une altération de l'alignement des chromosomes au cours de la méiose des ovocytes (voir chapitre 8). Ces observations conduisent à proposer que l'exposition au BPA pendant la reprise de méiose au moment de l'ovulation pourrait induire une augmentation de l'aneuploïdie, qui est une des causes majeures d'avortement spontané chez l'homme (Hunt et coll., 2003). Un défaut de méiose a été observé chez les souris C57BL/6 à la suite d'une exposition maternelle de BPA par voie orale ou par injection de 20 µg/kg/j par Hunt et coll. (2003), l'effet est similaire à celui observé chez les souris C57BL/6 inactivées pour le récepteur bêta des œstrogènes (Susiarjo et coll., 2007).

Après exposition néonatale, modification de la cyclicité, de la morphologie ovarienne et du comportement sexuel

A l'intérieur de l'axe HHG (axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique), la maturation et le fonctionnement reproductif sont coordonnés par la libération du GnRH, un petit peptide produit par l'hypothalamus. La sécrétion du GnRH est pulsatile et agit sur l'hypophyse pour stimuler la synthèse et la libération des hormones gonadotropes LH et FSH (*follicle-stimulating hormone*) (Pawson et coll., 2005). La libération de GnRH est contrôlée par une boucle de régulation incluant les hormones stéroïdes gonadiques. Chez les rongeurs, la différenciation sexuelle de ce circuit se met en place pendant la période néonatale, et a été montrée comme étant particulièrement sensible aux perturbations endocriniennes (Thigpen et coll., 2003 ; Howdeshell et coll., 2003).

L'équipe d'Adewale et coll. (2009) a étudié l'effet de faibles doses de BPA (50 µg/kg/jour) injectées chez le rat Long Evans âgé de 1 à 4 jours. Les auteurs montrent l'apparition d'une puberté précoce (avancement de l'âge de l'ouverture vaginale), une modification de la morphologie ovarienne (apparition de kystes) et de la cyclicité chez les animaux devenus adultes. Ces dysfonctionnements résultent d'une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique, notamment d'une altération du rétro-contrôle négatif par les hormones stéroïdes. Il est intéressant de noter que parmi les doses utilisées (50 µg et 50 000 µg/kg), la faible dose a l'effet le plus fort en termes d'induction de puberté précoce..

Une étude de Fernandez et coll. (2009) ciblant la période critique de différenciation de l'hypophyse (jour 13 postnatal) chez la femelle rat (Sprague-Dawley), montre que les niveaux de LH basaux et induits par le GnRH sont plus faibles chez les jeunes traitées au BPA (de jour 1 à 10) que chez les contrôles. Chez les femelles adultes, traitées en période néonatale, avec le BPA (50 et 500 µg/kg), la sécrétion hypophysaire de LH induite par le GnRH *in vivo* est diminuée et la pulsativité du GnRH est altérée.

Navarro et coll. (2009) ont montré chez le rat Wistar femelle injecté en sous-cutané avec 100 et 500 µg/animal de BPA, du jour 1 à 5 postnatal, une suppression des niveaux d'ARN messagers de KiSS-1 dans l'hypothalamus pouvant entraîner une altération du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire et de la sécrétion des hormones gonadotropes.

Une étude récente a montré chez la rate Sprague-Dawley injectée en sous-cutané journalièrement avec du BPA, 500 µg/50 µl, 50 µg/50 µl, 5 µg/50 µl du jour 1 au jour 10 postnatal, une morphologie anormale de l'ovaire présentant de nombreux kystes avec la concentration la plus élevée. La morphologie des ovaires est semblable à celle observée dans les cas d'ovaires polykystiques chez la femme. A la dose de 50 µg/50 µl, les femelles ont une fertilité réduite. A forte dose, les femelles sont toutes stériles (Fernandez et coll., 2010).

Enfin, il a également été montré une modification du comportement sexuel. Chez le rat Wistar injecté en sous-cutané avec 5 µg/kg/jour de BPA, de 1 à 7 jours postnatals, on observe une diminution de la réceptivité sexuelle. Cette diminution s'accompagne d'une expression réduite du récepteur alpha des œstrogènes dans les noyaux médians pré optiques et ventromédians de l'hypothalamus des descendants femelles à l'âge adulte (Monje et coll., 2009). Ces résultats indiquent que le BPA peut altérer de façon permanente le comportement sexuel chez la femelle adulte de rat, et que cet effet pourrait s'expliquer par des perturbations au niveau des structures hypothalamiques œstrogéno-dépendantes.

En résumé, les études récentes montrent que l'exposition des rongeurs à de faibles doses pendant la période néonatale (de 1 à 10 jours), qui est une période critique pour la mise en place du système HHG dans ces espèces, entraîne des modifications de la sécrétion des hormones ou des peptides produits par l'hypothalamus et l'hypophyse. Ces modifications du niveau et de la fréquence des sécrétions hormonales perturbent la fonction de reproduction sur le long terme puisque les effets sont observés au moment de la puberté ou à l'âge adulte.

En conclusion, cette analyse chez la femelle montre que les études ne reposent ni sur les mêmes lignées d'animaux, ni sur la même fenêtre d'exposition, ni sur les mêmes modes d'administration du BPA comme chez le mâle. Certaines ne précisent pas si les aliments et la boisson des animaux sont contrôlés du point de vue de leur contamination par le BPA ou d'autres perturbateurs endocriniens.

Cependant, malgré la diversité des protocoles expérimentaux, des effets concordants existent montrant que de faibles doses de BPA pendant des périodes critiques de développement ont des effets sur l'avancement de l'âge de la puberté, des effets sur le tractus génital de la femelle, sur la fonction ovarienne, sur le comportement des rats et des souris. Pour certains de ces effets, des mécanismes épigénétiques apparaissent en cause. Ces différents effets indiquent des actions au niveau du cerveau et de son fonctionnement (récepteurs, hormones).

De nouvelles approches commencent à être entreprises (transcriptome, protéome, métabolome, programmation épigénétique,) mettant en œuvre des méthodes plus sensibles (microarrays, quantitative RT-PCR, Chip, mesure des niveaux de méthylation...) qui permettront de détecter des variations plus fines que celles obtenues par des études fondées sur l'analyse morphologique. Elles devraient également permettre d'identifier les mécanismes altérés par le BPA au niveau cellulaire ou tissulaire qui pourront rendre compte des dysfonctionnements observés chez les animaux exposés.

BIBLIOGRAPHIE

ADEWALE HB, JEFFERSON WN, NEWBOLD RR, PATISAUL HB. Neonatal Bisphenol-A Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology Without Impairing Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons. *Biol Reprod* 2009, **81** : 690-699

CAKMAK H, TAYLOR HS. Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions. *Semin Reprod Med* 2010, **28** : 69-74

DURANDO M, KASS L, PIVA J, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM, et coll. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 80-86

- EVANS NP, NORTH T, DYE S, SWEENEY T. Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* 2004, **1** : 61-73
- FERNANDEZ M, BIANCHI M, LUX-LANTOS V, LIBERTUN C. Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 757-762
- FERNANDEZ MO, BOURGUIGNON N, LUX-LANTOS V, LIBERTUN C. Neonatal Exposure to Bisphenol A and Reproductive and Endocrine Alterations Resembling the Polycystic Ovarian Syndrome in Adult Rats. *Environ Health Perspect* 2010, epub
- HONMA S, SUZUKI A, BUCHANAN DL, KATSU Y, WATANABE H, IGUCHI T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* 2002, **16** : 117-122
- HOWDESHELL K, HOTCHKISS A, THAYER K, VANDENBERGH J, VOM SAAL F. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999, **401** : 763-764
- HOWDESHELL KL, PETERMAN PH, JUDY BM, TAYLOR JA, ORAZIO CE et coll. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1180-7
- HUNT PA, KOEHLER KE, SUSIARJO M, HODGES CA, ILAGAN A, et coll. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 2003, **13** : 546-553
- KATO H, OTA T, FURUHASHI T, OHTA Y, IGUCHI T. Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 2003, **17** : 283-288
- KHURANA S, RANMAL S, BEN-JONATHAN N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 2000, **141** : 4512-4517
- MARKEY C, COOMBS M, SONNENSCHNEIN C, SOTO A. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev* 2003, **5** : 67-75. Erratum in : *Evol Dev*. 2004, **6** : 207. Dosage error in article text.
- MARKEY CM, LUQUE EH, MUNOZ DE TM, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1215-1223
- MARKEY CM, WADIA PR, RUBIN BS, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenostrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 2005, **72** : 1344-1351
- MONJE L, VARAYOUD J, MUNOZ-DE-TORO M, LUQUE EH, RAMOS JG. Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reprod Toxicol* 2009,
- MOORS S, DIEP P, DEGEN GH. Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats after single i.v. application. *Arch Toxicol* 2006, **80** : 647-655
- MORAL R, WANG R, RUSSO IH, LAMARTINIERE CA, PEREIRA J, et coll. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol* 2008, **196** : 101-112
- NAVARRO VM, SANCHEZ-GARRIDO MA, CASTELLANO JM, ROA J, GARCIA-GALIANO D, et coll. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 2009, **150** : 2359-2367
- NEWBOLD RR, JEFFERSON WN, PADILLA-BANKS E. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* 2007, **24** : 253-258

- NEWBOLD RR, JEFFERSON WN, PADILLA-BANKS E. Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 879-885
- NIKAIDO Y, YOSHIZAWA K, DANBARA N, TSUJITA-KYUTOKU M, YURI T et coll. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 803-811
- NISHIKAWA M, IWANO H, YANAGISAWA R, KOIKE N, INOUE H, et coll. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ Health Perspect* 2010, Ahead of print 09 April 2010
- PALANZA PL, HOWDESHELL KL, PARMIGIANI S, VOM SAAL FS. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 2002, **110 Suppl 3** : 415-422
- PAWSON A, MCNEILLY A. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005, **88** : 75-94
- RAMOS JG, VARAYOUD J, KASS L, RODRIGUEZ H, COSTABEL L, et coll. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 2003, **144** : 3206-3215
- RUBIN BS, MURRAY MK, BAMASSA DA, KING JC, SOTO AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 675-680
- RYAN BC, HOTCHKISS AK, CROFTON KM, GRAY LE, JR. In Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A, in contrast to Ethinyl Estradiol, Does not Alter Sexually Dimorphic Behavior, Puberty, Fertility and Anatomy of Female LE Rats. *Toxicol Sci* 2010, **114** : 133-148
- RYAN BC, VANDENBERGH JG. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav* 2006, **50** : 85-93
- SAVABIEASFAHANI M, KANNAN K, ASTAPOVA O, EVANS NP, PADMANABHAN V. Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology* 2006, **147** : 5956-5966
- SCHÖNFELDER G, FLICK B, MAYR L, TALSNESS C, PAUL M, CHAHOUD I. In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* 2002, **4** : 98-102
- SCHÖNFELDER G, FRIEDRICH K, PAUL M, CHAHOUD I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia* 2004, **6** : 584-94
- SIGNORILE PG, SPUGNINI EP, MITA L, MELLONE P, D'AVINO A, et coll. Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen Comp Endocrinol* 2010, Mar 27. [Epub ahead of print]
- SMITH CC, TAYLOR HS. Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. *FASEB J* 2007, **21** : 239-246
- SUSIARJO M, HASSOLD TJ, FREEMAN E, HUNT PA. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 2007, **3** : e5
- THIGPEN JE, HASEMAN JK, SAUNDERS HE, SETCHELL KDR, GRANT MG, FORSYTHE DB. Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp Med* 2003, **53** : 477-485
- TINWELL H, HASEMAN J, LEFEVRE PA, WALLIS N, ASHBY J. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 339-348
- TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 2008, **104** : 362-384
- TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146

VARAYOUD J, RAMOS JG, BOSQUIAZZO VL, MUNOZ-DE-TORO M, LUQUE EH. Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 2008, **149** : 5848-5860

5

Effets cellulaires et tissulaires : dysfonctionnement et précancérisation

Au cours des dernières années, il a été rapporté une association entre exposition pendant la période gestationnelle ou néonatale au BPA et des pathologies incluant des lésions pré-néoplasiques et néoplasiques de différents tissus tels que la glande mammaire (Durando et coll., 2007 ; Murray et coll., 2007), la prostate (Ho et coll., 2006), ou l'endométriose (Signorile et coll., 2010).

Effets sur les cellules de la prostate

De nombreux travaux ont démontré l'effet de diverses substances à activité œstrogénique sur le développement de la prostate. Ainsi, il existe une littérature globalement concordante indiquant que l'éthynil œstradiol, l'œstradiol, le diéthylstilbestrol (DES) ou le méthoxychlore, administrés *in utero* à de faibles doses, peuvent augmenter de manière permanente la taille de la prostate chez les rongeurs.

Une étude expérimentale chez les rongeurs suggère que le BPA pourrait avoir un effet identique (Ho et coll., 2006). Cependant, les données concernant ce produit apparaissent plus confuses, parfois contradictoires du fait de la multiplicité des protocoles d'administration, des critères étudiés et des doses employées (Milman et coll., 2002).

Ainsi, plusieurs auteurs ne retrouvent pas d'effet sur la taille de la prostate en réponse au BPA. Par exemple, deux études de Tyl (2002 et 2008) conduites sur 3 générations chez le rat et sur deux générations chez la souris et analysant les effets d'un large éventail de doses de BPA administré oralement ne rapportent aucun effet sur le poids de la prostate.

Par ailleurs, il n'y a pas de démonstration qui prouve qu'une augmentation du poids est un indice de transformation chez le rongeur. Une explication possible semble être que l'administration de fortes doses de substances œstrogéniques inhibe globalement la croissance de la prostate et que le BPA semble avoir des effets différents en fonction des lobes de la prostate (Ogura et coll., 2007). Il est cependant difficile d'établir une correspondance entre l'anatomie lobaire de la prostate de la souris et l'anatomie zonale de la prostate humaine.

L'étude fondatrice qui amena le questionnement des effets du BPA sur le développement de la prostate a été celle de Nagel et coll. (1997). Les auteurs y rapportent les effets de l'administration par voie orale de 2 000 et 20 000 µg/kg/j de BPA *in utero* et observent à l'âge adulte une nette augmentation du poids de la prostate. Cette étude apparemment claire ne décrit cependant pas l'histologie des tissus prostatiques. Plus récemment, il a été suggéré que de faibles doses de BPA peuvent augmenter l'expression du récepteur aux androgènes (AR) dans la prostate fœtale murine (Richter et coll., 2007). Un tel mécanisme est concordant avec les effets d'autres substances œstrogéniques et expliquerait un accroissement de taille de la prostate dont la croissance est régulée par les androgènes. Par la suite, des travaux utilisant

des doses plus faibles de BPA (10 à 20 µg/kg/j) pendant la vie fœtale ou néonatale rapportent des effets permanents (persistants chez l'adulte) sur la prostate sans modification du poids de celle-ci. Ainsi le traitement de souris *in utero* induit l'expression anormale de la cytokératine 10 (CK10) dans l'épithélium prostatique de mâles adulte (Ogura et coll., 2007). Les mêmes auteurs rapportent un effet semblable s'accompagnant d'une désorganisation de l'épithélium (métaplasie squameuse) à l'âge adulte et dans un modèle *in organo*. Le BPA semble donc agir directement sur la prostate et lorsque l'exposition a lieu au cours de la vie fœtale, l'effet apparaît comme permanent. Une autre étude indique qu'une exposition néonatale au BPA chez le rat altère définitivement l'expression d'une trentaine de gènes par des mécanismes impliquant la méthylation de l'ADN (Ho et coll., 2006). Les auteurs détaillent notamment que le BPA maintient définitivement l'expression de la phosphodiesterase 4D (PDE4D4), une enzyme impliquée dans la dégradation de l'AMPc, en bloquant la méthylation du promoteur de ce gène. L'exposition néonatale au BPA pourrait donc altérer la mémoire épigénétique de la prostate.

De manière encore plus frappante, les mêmes auteurs décrivent l'apparition de lésions précancéreuses, ou néoplasie prostatique intra-épithéliale (PIN), chez des rats traités au BPA durant la vie néonatale puis traités ensuite à l'âge adulte par des implants d'œstradiol et de testostérone. Chez ces animaux, on observe une dysplasie sévère et la survenue d'adénome. La période néonatale chez le rat semble donc être une fenêtre critique pendant laquelle le BPA pourrait définitivement altérer la programmation de la prostate et ainsi prédisposer à la survenue de lésions pré-cancéreuses dans le cas d'une perturbation additionnelle à l'âge adulte.

L'existence de mutations dans le gène codant pour le récepteur aux androgènes pourrait être un mécanisme de sélection de cellules tumorales prostatiques et constitue un facteur de risque. Dans ce cadre, il est à noter que le BPA pourrait stimuler la progression de tels cancers. En effet, une étude rapporte qu'à de faibles doses (1nM), le BPA stimule spécifiquement la prolifération de cellules tumorales prostatiques (LNCaP) portant la mutation AR - T877A (Hess-Wilson et coll., 2007).

Effets sur les cellules mammaires

Le développement de la glande mammaire implique deux grandes étapes (pendant la vie périnatale, puis à la puberté) de croissance et de ramifications des canaux épithéliaux qui vont envahir le « coussin adipeux » avoisinant (stroma). Ces structures épithéliales contiennent deux couches de cellules différentes : les cellules basales (myo-épithéliales) à proximité du stroma mammaire et les cellules luminales à activité sécrétoire. Pendant la gestation un tissu sécrétoire se forme. Le cancer du sein est le premier cancer de la femme mais son étiologie est encore mal connue. La grande majorité des cancers du sein sont des cancers canaux *in situ*. Les carcinomes *in situ* (CIS) mammaires sont œstrogéno-dépendants (dans le cas général, ceux-ci expriment ERα ; leur croissance est alors stimulée par les œstrogènes ou parfois peut-être inhibée par le tamoxifène).

De nombreux travaux indiquent de manière cohérente qu'une exposition développementale (fœtale ou périnatale) au BPA modifie l'architecture de la glande mammaire à l'âge adulte chez les rongeurs. Chez le rat et chez différentes souches de souris de faibles doses de BPA (2,5 et 25 µg/kg/j) administrées *in utero* augmentent la densité, la ramification et le nombre de canaux et d'alvéoles et induisent une hyperplasie des canaux terminaux. Il est à noter que ces structures sont à l'origine des CIS mammaires chez le rat et l'homme. Ces travaux indiquent donc qu'il pourrait exister un risque accru de tumeurs mammaires. Des doses plus fortes (250 µg/kg/j) *in utero* chez le rat peuvent induire directement l'apparition de lésions

cancéreuses de type CIS à la puberté et l'âge adulte (Murray et coll., 2007). Ces CIS induits à fortes doses et les zones hyperplasiques observées dans les canaux épithéliaux à plus faibles doses sont caractérisés par une forte activité prolifératrice et l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER α). L'exposition au BPA au cours du développement peut donc induire l'apparition de lésions pré-néoplasiques ou la transformation néoplasique de la glande mammaire du rat.

De manière intéressante ce processus a été détaillé à plusieurs étapes. A court terme, en fin de vie fœtale, les premiers effets morphologiques du BPA sur la glande mammaire sont déjà visibles et ce, même à de faibles doses (0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$). A ce stade, le BPA accélère la maturation du coussin adipeux et retarde la formation de la lumière dans les canaux (Vandenberg et coll., 2006). Ces effets sont reliés à une modification des taux d'apoptose dans les deux compartiments (stroma et épithélium). Au moment de la puberté, les effets morphologiques apparaissent plus subtils mais la sensibilité de la glande mammaire à l'œstradiol est nettement augmentée et une diminution de l'apoptose épithéliale et stromale a également été rapportée (Munoz-de-Toro et coll., 2005 ; Durando et coll., 2007 ; Wadia, et coll., 2007). Il est donc suggéré que l'exposition aux hormones ovariennes à partir de la puberté participe au développement des lésions observées plus tard dans les glandes mammaires exposées au BPA pendant la vie fœtale. A l'âge adulte, toutes les études rapportent une augmentation des structures terminales des canaux (Markey et coll., 2001 ; Munoz-de-Toro et coll., 2005 ; Moral et coll., 2008 ; Vandenberg, et coll., 2008) pour des doses variables (de 2,5 à 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ *in utero*). Une hyperplasie de ces structures est également décrite (Murray et coll., 2007).

Enfin, une étude conduite chez le rat démontre qu'une exposition prénatale à de faibles doses de BPA (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) augmente la susceptibilité de la glande mammaire adulte à un agent carcinogène. Bien que conduite sur un effectif limité (n=18) cette étude rapporte l'apparition de CIS dans les canaux mammaires en réponse à une dose considérée comme sub-carcinogénique de N-nitroso-N-méthylurée (NMU) uniquement chez les animaux traités au BPA *in utero* (Durando et coll., 2007). De même, il a été montré un rôle amplificateur du BPA dans l'apparition de tumeurs mammaires suite à une exposition à un agent cancérigène, le diméthylbenzanthracène (DMBA). Cette étude effectuée chez le rat montre que les femelles dont la mère a été traitée avec du BPA à 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ or 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$, du jour 2 au jour 20 postnatal (pendant toute la lactation) ont plus de tumeurs mammaires (à 50 jours postnatals) lorsqu'elles reçoivent une injection de DMBA (30 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Jenkins et coll., 2009). Les effets augmentent en fonction de la dose de BPA. Cependant les effectifs sont faibles (inférieurs à 10) et ce type d'expérience mériterait d'être validée sur un plus grand nombre d'animaux.

Des travaux récents menés chez des rates gestantes exposées oralement au BPA (25, 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$) du jour 10 au jour 21 post-conception ont montré des variations au niveau des protéomes mammaires des descendantes femelles âgées de 21 et 50 jours. L'analyse protéomique a révélé 21 protéines différentiellement exprimées entre les animaux exposés et les contrôles. Les résultats ont été confirmés par Western-blot pour certaines d'entre elles. La surexpression de la vimentine, de phospho-AKT, c-Raf, phospho-ERKs-1 and 2 a été associée à des processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation ou encore la tumorigenèse comme les membres des familles Raf et ERK. Ces effets pourraient potentiellement augmenter la susceptibilité à la cancérisation des cellules mammaires. (Betancourt et coll., 2010).

Enfin, une étude menée sur une lignée de cellules de cancer du sein démontre que de faibles doses de BPA (0,1 nM) protègent ces cellules cancéreuses de divers agents chimiothérapeutiques (Lapensée et coll., 2009). Ainsi le BPA pourrait être impliqué à la fois

dans la survenue et dans la progression des cancers du sein. Dans ces travaux les auteurs observent que le BPA augmente l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que les facteurs de la famille de Bcl2. Par ailleurs, une autre étude renforce l'idée que le BPA pourrait contribuer à la progression de cancer du sein (Buteau-Lozano et coll, 2008). Dans cette étude, le BPA augmente de façon concentration-dépendante l'expression du VEGF dans une lignée de cellules dérivées de cancer du sein, or le VEGF est un facteur connu pour promouvoir la néo-angiogenèse dans diverses tumeurs.

En résumé de nombreux travaux démontrent que l'exposition au BPA durant la vie fœtale pendant l'organogenèse mammaire peut modifier le développement de cet organe, augmenter sa sensibilité aux œstrogènes à la puberté et conduire à l'apparition de lésions pré-néoplasiques. Notons que ces lésions ne mènent pas obligatoirement à la survenue d'un cancer mais créeraient un état permissif qui pourrait conduire à un cancer. Il s'agit donc d'une augmentation du risque de développer un carcinome qui pourrait être aggravé par d'autres facteurs à l'âge adulte (vieillesse ou exposition à des agents carcinogènes). Un des mécanismes par lesquels le BPA pourrait modifier la susceptibilité aux carcinogènes impliquerait un changement global de l'expression des gènes dans la glande mammaire. Le plus fort changement dans la signature génomique en réponse à une exposition fœtale à de faible dose de BPA aurait lieu autour de la puberté (Moral et coll., 2008). L'origine, stromale ou épithéliale de ces altérations apparaît encore incertaine et les mécanismes mal compris. Le BPA agit-il via les récepteurs aux œstrogènes ? Le développement de modèles murins (souris transgéniques) pour étudier la réponse de la glande mammaire au BPA devrait permettre d'identifier prochainement les récepteurs impliqués. Bien que les données chez les rongeurs apparaissent globalement convaincantes, il n'y a, à ce jour, aucune étude qui démontre un effet développemental du BPA chez l'être humain. Le développement de ce type de tumeurs semble cependant similaire d'un point de vue histologique.

Soulignons ici, la ressemblance du cancer du sein et de celui de la prostate, évoqué précédemment. Les deux sont majoritairement issus de carcinomes et sont hormono-dépendants. Tous deux semblent pouvoir être induits par une altération de la programmation développementale de l'organe par le BPA et celle-ci augmenterait la probabilité de transformation néoplasique en réponse à une agression carcinogénique à l'âge adulte.

Effets sur les cellules de l'endomètre

Effet sur l'endothélium de l'endomètre

L'endomètre est la muqueuse de l'utérus. Ce tissu richement vascularisé recouvre la paroi interne de l'utérus et se développe à chaque cycle au cours de la vie fertile pour éventuellement permettre l'implantation de l'embryon. La croissance de l'endomètre est sous le contrôle des hormones stéroïdes ovariennes ce qui fait de ce tissu une cible potentielle pour les perturbateurs endocriniens. Lors de la grossesse, l'endomètre s'épaissit et participe à la formation du placenta. En absence d'implantation, l'endomètre se desquame ce qui produit alors les menstruations. Le réseau vasculaire de l'endomètre doit donc se renouveler à chaque cycle menstruel. Les cellules endothéliales qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins contrôlent le développement et le remodelage du réseau vasculaire.

Deux études de la même équipe se sont intéressées aux effets du BPA sur les cellules endothéliales de l'endomètre humain (Bredhult et coll., 2007, 2009). Il a ainsi été démontré qu'une exposition aiguë à de fortes doses de BPA (100 µM) diminue la prolifération et la

viabilité de ces cellules en culture. L'analyse du profil d'expression génique des cellules exposées au BPA révèle une forte diminution de plusieurs gènes impliqués dans la division cellulaire (complexe kinétochorien, attachement au centromère, *chromosomal passenger complex*). Cette étude (Bredhult et coll., 2009) suggère donc que le BPA pourrait perturber une fonction majeure pour l'endomètre, l'angiogenèse. Bien que les données produites par cette équipe apparaissent cohérentes, les doses utilisées dépassent de loin les niveaux retrouvés dans le sang en population générale. Cependant, il est à noter que l'effet inhibiteur de la prolifération a également été obtenu avec des doses plus faibles (10 nM) et que le modèle *in vitro* d'exposition aiguë est difficilement comparable avec une exposition chronique à de faibles doses (Bredhult et coll., 2007).

Par ailleurs, un travail récent utilisant les cellules Ishikawa, un modèle de cellule humaine endométriale (lignée cancéreuse), montre que l'exposition de ces cellules à 100 µM de BPA modifie profondément leur signature transcriptomique dès 8 heures (Naciff et coll., 2010). Parmi les gènes régulés, plusieurs semblent pouvoir être utilisés comme les témoins d'une signature œstrogénique puisqu'ils sont également régulés par l'éthinyl œstradiol dans ces cellules et dans l'utérus de rat *in vivo*. De manière surprenante, l'expression de plusieurs gènes est également modifiée par des doses de l'ordre du nanomolaire (1nM) sous le seuil estimé d'éventuels effets œstrogéniques du BPA.

Association avec l'endométriose

L'endométriose est une pathologie fréquemment associée à des défauts de fertilité. Elle est caractérisée par le développement de tissus endométriaux en dehors de la cavité utérine. Ces tissus s'implantent couramment dans la cavité péritonéale, au niveau de l'ovaire. La fréquence de cette pathologie est difficile à déterminer car elle nécessite une laparoscopie mais on la retrouve dans environ 40 % cas de consultation pour des problèmes de fertilité féminine. L'étiologie de cette pathologie est encore peu comprise. Deux études présentées dans le chapitre « études épidémiologiques » se sont intéressées à la relation entre endométriose et taux de bisphénols. Une étude réalisée sur une cohorte de 140 patientes japonaises se plaignant de stérilité (Itoh et coll., 2007) n'a pas trouvé d'association entre endométriose et le taux urinaire de BPA. Dans cette cohorte, le BPA a été retrouvé dans 93 % des urines testées. L'autre étude portant sur 69 femmes fertiles adressées à l'hôpital de Naples, Italie (Cobellis et coll., 2009) rapporte une forte corrélation entre le taux de bisphénols A et B dans le sang et le diagnostic d'endométriose. L'étude italienne reste préliminaire au vue de l'effectif restreint et est actuellement la seule donnée reliant des taux de bisphénols à une pathologie endométriale. Cette étude mériterait d'être reproduite sur une plus large cohorte.

Une étude récente (Signorile et coll., 2010) démontre une augmentation de la fréquence d'apparition de structures semblables à de l'endométriose dans le tissu adipeux entourant le tractus génital des souris femelles dès 3 mois. Ces structures expriment ER et Hoxa10 et s'accompagne d'hyperplasies endométriales. Dans ce travail les souris BALBC ont été exposées au BPA à de fortes doses injectées en sous cutané (100 et 1000 µg/kg/j) dès le premier jour de la gestation jusqu'au 7^e jour post-natal. L'occurrence de tissus de type endométriaux en dehors du tractus femelle a été démontrée par une approche histologique. Ces structures de type glande ou stroma endométrial évoquant une endométriose ont été observées dans 13 femelles traitées sur 40 alors qu'une seule femelle parmi les 20 témoins présentait des structures analogues. Du BPA (libre) a été retrouvé dans le foie de toutes les femelles traitées (mères) et de leur descendance sans qu'il y ait de corrélation avec la survenue d'une pathologie semblable à l'endométriose.

En résumé, bien que les tissus endométriaux soient très sensibles aux œstrogènes et à la progestérone, il existe à l'heure actuelle peu d'études convaincantes démontrant un effet du BPA sur ce tissu chez l'être humain aux doses compatibles à celles retrouvées dans l'environnement. Un seul travail expérimental chez la souris propose qu'une exposition au BPA pendant le développement puisse induire la survenue de cette pathologie. Cette donnée est originale car elle laisse à penser qu'une perturbation du développement est à l'origine de la pathologie et non que celle-ci se développe à l'âge adulte au moment du fonctionnement cyclique de l'endomètre. Cette étude nécessite d'être confirmée sur un effectif plus large et le mécanisme d'action d'être identifié avant de pouvoir certifier l'existence d'un lien causal entre exposition fœtale au BPA et endométriose.

Si le lien entre exposition à des faibles doses de BPA et une pathologie endométriale reste à établir, des données solides démontrent nettement une altération des gènes cruciaux pour le fonctionnement de l'endomètre lors d'une exposition développementale chez les rongeurs. Ainsi, une exposition au BPA pendant certaines périodes clés pourrait altérer de manière permanente la programmation de l'utérus et sa réponse aux hormones stéroïdes à l'âge adulte.

Effets sur les cellules de la granulosa

L'unité fonctionnelle de l'ovaire est le follicule qui est composé de cellules somatiques et de l'ovocyte. La granulosa est une couche de cellules folliculaires granuleuses entourant l'œuf et la cavité liquidienne du follicule ovarien qui est responsable de la sécrétion de la progestérone durant la deuxième moitié d'un cycle ovarien (corps jaune périodique) ou durant les 4 premiers mois de la grossesse (corps jaune gravidique). Durant la première partie du cycle, les cellules de la granulosa se multiplient pour former plusieurs dizaines de couches autour de l'ovocyte. Dans leur épaisseur se créent des cavités remplies de liquide folliculaire. Par confluence, elles donnent une cavité unique, l'antrum, alors que l'ovocyte entouré d'une seule couche cellulaire (future corona radiata) est rejeté en périphérie.

Chez le rat Sprague-Dawley, Zhou et coll. (2008) ont développé des cultures primaires à partir de femelles immatures (25 jours). Deux types de cellules ont été étudiés, les cellules T-I (*rat ovarian theca-interstitial cells*) et les cellules de la granulosa (à partir de femelles non stimulées). Les auteurs ont montré que le BPA entraîne des perturbations de l'expression des enzymes clés de la stéroïdogenèse. Sur les cellules de la thèque, on constate une augmentation de testostérone, d'ARNm de P450c17 tandis que P450SCC diminue. Sur les cellules de la granulosa, l'œstradiol et la prégnénolone augmentent, l'ARNm de la P450 aromatasé diminue à fortes doses. Le BPA pourrait induire une hyperandrogénie, et l'on sait que cette anomalie est impliquée dans l'apparition du syndrome des ovaires polykystiques (PCOS).

Une équipe japonaise a étudié l'effet de faibles concentrations de BPA (100 fM-100 µM) sur des cellules de granulosa issues de souris B6C3F1 en culture pendant 24 et 72 h. Ils montrent que le BPA agit sur la viabilité de ces cellules de façon dépendant de la concentration et du temps (Xu et coll., 2002). Le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) révèle que le BPA augmente l'apoptose des cellules de la granulosa et les analyses effectuées par cytométrie en flux révèlent un arrêt de la transition G2-M du cycle cellulaire. Le BPA augmente l'expression de Bax et de manière concomitante diminue l'expression de Bcl2 à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine.

Grasselli et coll. (2010) ont montré sur des cultures primaires de cellules de granulosa prélevées à partir d'ovaires de truies collectés à l'abattoir, incubées avec 0,1, 1 ou 10 μM pendant 48 h, que le BPA à toutes les concentrations testées inhibe la production de progestérone et perturbe la stéroïdogénèse ovarienne. Le BPA entre 1 et 10 μM stimule la sécrétion de VEGF dans les cellules de granulosa porcines impliqué dans le processus angiogénique, la promotion de la néovascularisation et la modification de la perméabilité vasculaire et pourrait ainsi intervenir dans le *timing* de la formation de l'antrum. Bien que ces effets soient observés sur du court terme (48 h), ils décrivent un autre mode d'action possible du BPA à savoir une action sur le processus de la vascularisation du follicule.

Enfin chez l'homme, Kwintkiewicz et coll. (2010) ont développé un modèle *in vitro* à partir de cellules primaires de granulosa récupérées lors de fécondation *in vitro* ou de lignées cellulaires KGN (issus de granulosa) traitées avec FSH, BPA, FSH+BPA, ainsi que des cellules KGN transfectées avec le récepteur PPARgamma. Les auteurs montrent que le BPA affecte la sécrétion d'œstradiol et l'expression des facteurs de transcription IGF1, SF1, GATA4 ainsi que l'aromatase en réponse à FSH. Ils observent une sur-expression de PPARgamma. Les effets de la sur-expression de PPARgamma dans les cellules KGN sont similaires à ceux observés avec le BPA. Les auteurs en concluent que les effets du BPA passeraient par le récepteur PPARgamma et que les effets inhibiteurs du BPA sur la sécrétion E2 (stimulée par FSH) dans les cellules de granulosa humaines sont médiées par la surexpression de PPARgamma.

Effets sur les cellules du testicule

Des effets du BPA ont été rapportés dans des lignées ou culture de cellules primaires correspondant aux principaux types cellulaires du testicule : cellules germinales, cellules de Leydig et cellules de Sertoli. Bien que s'appuyant sur des lignées cellulaires, ces travaux permettent actuellement de proposer des pistes mécanistiques pour expliquer les effets du BPA.

Les séminomes sont des tumeurs que l'on pense d'origine germinale, probablement issues des gonocytes du testicule fœtal, dont la morphologie est voisine. Le BPA pourrait exercer des effets via un mécanisme indépendant de ER nucléaires sur les cellules de séminome (JKT1) –voir le chapitre 7 sur mécanismes d'action-. L'étude récente de Bouskine et coll. (2009) a montré que des niveaux de BPA très faibles (10^{-12}M) peuvent augmenter la prolifération de lignées cellulaires de séminome via un mécanisme faisant intervenir un récepteur membranaire des œstrogènes couplé à une protéine G « *membrane G-protein-coupled estrogen receptor* ». Dans une autre lignée de cellules germinales (cellules GC1), Ooeh et coll. (2005) trace un lien intéressant entre l'exposition au BPA et le stress oxydatif. Dans cette lignée le BPA (100 μM) induit la production de radicaux libres de l'oxygène. Cet effet du BPA ne semble pas spécifique des cellules germinales, mais de tels radicaux, susceptibles de générer un stress génotoxique, sont particulièrement à risque dans les cellules germinales connues pour leur grande sensibilité envers ce type de stress.

Dans une lignée de cellules de Leydig murines (K28), le BPA à faibles doses (1 à 10 nM) induit l'expression de NR4A1, un facteur de transcription (Song et coll., 2002) dès 30 minutes.

Dans une lignée de cellule de Sertoli (SerW3), le BPA réduit l'expression de l'occludine, de la N-Cadhérine et de la connexine 43, ce qui laisse supposer que le BPA pourrait perturber la barrière hémato-testiculaire (Fiorini et coll., 2004). Des données similaires ont été obtenues avec des cellules de Sertoli de rat en culture primaire (Li et coll., 2009). En culture, le BPA

(200 µM) perturbe les jonctions serrées entre les cellules de Sertoli, ce qui correspond aux effets décrits par les mêmes auteurs sur la barrière hémato-testiculaire *in vivo* chez le rat immature (Li et coll., 2009). En revanche chez le rat adulte ces effets n'ont pas été observés.

En conclusion, chez le rat ou la souris, plusieurs effets résultant d'une exposition au BPA au cours de la période foetale ou périnatale témoignent d'une altération durable de la programmation de différents tissus, pouvant se traduire par la survenue de pathologies à l'âge adulte, tels les cancers de la prostate, du sein ou l'endométriose. De tels travaux bien qu'encore peu nombreux changent considérablement la façon d'appréhender la mesure des effets toxiques du BPA qui sera évidemment longue et complexe à prendre en compte chez l'être humain. Il est donc important de vérifier ces données dans des modèles de mammifères ayant des caractéristiques physiologiques proches de l'espèce humaine. La définition des fenêtres d'exposition au cours desquelles les effets sont les plus sévères doit tenir compte des spécificités d'espèce. Des études longitudinales (suivi à plusieurs stades de la vie) devront être conduites pour évaluer les mécanismes d'adaptation.

Par ailleurs, les travaux réalisés sur diverses lignées cellulaires proposent des mécanismes d'actions très divers du BPA qui ne se cantonnent pas aux effets de type œstrogéniques. L'importance de tels mécanismes dans les effets du BPA reste à démontrer dans des modèles *in vivo*. Des analyses moléculaires fines issues de l'étude du transcriptome, du protéome, du métabolome des tissus et cellules exposés au BPA à faibles doses contribueront à mieux comprendre les mécanismes d'action. Ces approches intégratives globales seront nécessaires pour appréhender l'ensemble des effets du BPA sur un tissu donné.

Quelques études ont également montré une altération des marques épigénétiques au niveau des gamètes suite à des expositions au BPA. Elles posent le problème de la transmission des effets délétères aux générations suivantes. C'est pourquoi les études longitudinales doivent être poursuivies sur plusieurs générations.

Enfin, les études *in vivo* réalisées dans plusieurs souches d'une même espèce, montrent des variabilités intra espèce (et inter individu) de réponse au BPA. Ces variabilités sont le reflet des variations des patrimoines génétiques (polymorphisme au niveau des génomes) et également des expositions antérieures subies (génération(s) précédente(s), vie intra-utérine, environnement et alimentation au cours des différentes phases de vie, exposition à d'autres composés). L'observation de résultats opposés ou la mise en évidence de sensibilité différente de certaines souches ne sont donc pas des arguments en faveur de l'absence d'effets mais doivent être utilisés pour comprendre en quoi ces différences (génétiques, environnementales) modulent la réponse au BPA. Il s'agit là de pistes pour identifier des populations ou des conditions ou pratiques de vie à risque.

BIBLIOGRAPHIE

BETANCOURT AM, MOBLEY JA, RUSSO J, LAMARTINIERE CA. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. *J Proteomics* 2010, **73** : 1241-1253

BOUSKINE A, NEBOUT M, BRUCKER-DAVIS F, BENAHMED M, FENICHEL P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1053-1058

BREDHULT C, BACKLIN BM, OLOVSSON M. Effects of Some Endocrine Disruptors on the Proliferation and Viability of Human Endometrial Endothelial Cells in Vitro. *Reprod Toxicol* 2007, **23** : 550-559

- BREDHULT C, SAHLIN L, OLOVSSON M. Gene Expression Analysis of Human Endometrial Endothelial Cells Exposed to Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2009, **28** : 18-25
- BUTEAU-LOZANO H, VELASCO G, CRISTOFARI M, BALAGUER P, PERROT-APPLANAT M. Xenoestrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *J Endocrinol.* 2008 **196** : 399-412
- COBELLIS L, COLACURCI N, TRABUCCO E, CARPENTIERO C, GRUMETTO L. Measurement of Bisphenol A and Bisphenol B Levels in Human Blood Sera From Healthy and Endometriotic Women. *Biomed Chromatogr* 2009,
- DURANDO M, KASS L, PIVA J, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM, et coll. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 80-86
- FIORINI C, TILLOY-ELLUL A, CHEVALIER S, CHARUEL C, POINTIS G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 413-421
- GRASELLI F, BARATTA L, BAIONI L, BUSSOLATI S, RAMONI R, et coll. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol* 2010, [Epub ahead of print]
- HESS-WILSON JK, WEBB SL, DALY HK, LEUNG YK, BOLDISON J, et coll. Unique bisphenol A transcriptome in prostate cancer : novel effects on ERbeta expression that correspond to androgen receptor mutation status. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1646-1653
- HO SM, TANG WY, BELMONTE DE FJ, PRINS GS. Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Res* 2006, **66** : 5624-5632
- ITOH H, IWASAKI M, HANAOKA T, SASAKI H, TANAKA T, et coll. Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis : A cross-sectional study. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2007, **12** : 258-264
- JENKINS S, RAGHURAMAN N, ELTOUM I, CARPENTER M, RUSSO J, et coll. Oral exposure to bisphenol a increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ Health Perspect* 2009, **17** : 910-915
- KWINTKIEWICZ J, NISHI Y, YANASE T, GIUDICE LC. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Mediates the Endocrine Disrupter Bisphenol A Inhibition of FSH-stimulated IGF-I, Aromatase and Estradiol in Human Granulosa Cells. *Environ Health Perspect* 2009, **epub 22 octobre 2010** : 1-39
- LAPENSEE EW, TUTTLE TR, FOX SR, BEN-JONATHAN N. Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 175-180
- LI MW, MRUK DD, LEE WM, CHENG CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41** : 2302-2314
- MARKEY CM, LUQUE EH, MUNOZ DE TM, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. In Utero Exposure to Bisphenol A Alters the Development and Tissue Organization of the Mouse Mammary Gland. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1215-1223
- MILMAN HA, BOSLAND MC, WALDEN PD, HEINZE JE. Evaluation of the Adequacy of Published Studies of Low-Dose Effects of Bisphenol A on the Rodent Prostate for Use in Human Risk Assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002, **35** : 338-346
- MORAL R, WANG R, RUSSO IH, LAMARTINIERE CA, PEREIRA J, et coll. Effect of Prenatal Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A on Mammary Gland Morphology and Gene Expression Signature. *J Endocrinol* 2008, **196** : 101-112
- MUNOZ-DE-TORO M, MARKEY CM, WADIA PR, LUQUE EH, RUBIN BS, et coll. Perinatal Exposure to Bisphenol-A Alters Peripubertal Mammary Gland Development in Mice. *Endocrinology* 2005, **146** : 4138-4147

- MURRAY TJ, MAFFINI MV, UCCI AA, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. Induction of Mammary Gland Ductal Hyperplasias and Carcinoma in Situ Following Fetal Bisphenol A Exposure. *Reprod Toxicol* 2007, **23** : 383-390
- NACIFF JM, KHAMBATTA ZS, REICHLING TD, CARR GJ, TIESMAN JP, et coll. The genomic response of Ishikawa cells to bisphenol A exposure is dose- and time-dependent. *Toxicology* 2010, **270** : 137-149
- NAGEL SC, VOM SAAL FS, THAYER KA, DHAR MG, BOECHLER M, WELSHONS WV . 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*. 1997, **105** : 70-6.
- OOE H, TAIRA T, IGUCHI-ARIGA SM, ARIGA H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 2005, **88** : 114-126
- OGURA Y, ISHII K, KANDA H, KANAI M, ARIMA K, et coll. Bisphenol A Induces Permanent Squamous Change in Mouse Prostatic Epithelium. *Differentiation* 2007, **75** : 745-756
- RICHTER CA, TAYLOR JA, RUHLEN RL, WELSHONS WV, VOM SAAL FS. Estradiol and Bisphenol A Stimulate Androgen Receptor and Estrogen Receptor Gene Expression in Fetal Mouse Prostate Mesenchyme Cells. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 902-908
- SIGNORILE PG, SPUGNINI EP, MITA L, MELLONE P, D'AVINO A, et coll. Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen Comp Endocrinol* 2010, Mar 27. [Epub ahead of print]
- SONG KH, LEE K, CHOI HS. Endocrine disrupter bisphenol a induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology* 2002, **143** : 2208-2215
- TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 2008, **104** : 362-384
- TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146
- VANDENBERG LN, MAFFINI MV, SCHAEBERLE CM, UCCI AA, SONNENSCHNEIN C, et coll. Perinatal Exposure to the Xenoestrogen Bisphenol-A Induces Mammary Intraductal Hyperplasias in Adult CD-1 Mice. *Reprod Toxicol* 2008, **26** : 210-219
- WADIA PR, VANDENBERG LN, SCHAEBERLE CM, RUBIN BS, SONNENSCHNEIN C, et coll. Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Estrogen Sensitivity of the Mammary Gland in Diverse Mouse Strains. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 592-598
- XU J, OSUGA Y, YANO T, MORITA Y, TANG X, et coll. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **292** : 456-462
- ZHOU W, LIU J, LIAO L, HAN S, LIU J. Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008, **283** : 12-18

6

Effets chromosomique, génétique et épigénétique

Chaque individu présente les caractères de l'espèce avec des variations qui lui sont propres, résultant de l'expression de son programme génétique et de l'influence environnementale. Les caractères héréditaires, spécifiques de l'espèce sont transmis par les parents, de génération en génération. Ces caractères héréditaires sont déterminés par un ensemble d'informations contenues dans les chromosomes, supports du programme génétique (génome). Le support des gènes est constitué par la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) formé de deux brins complémentaires. La division cellulaire (mitose) assure le transfert de l'information génétique d'une cellule mère aux cellules filles. Seules les cellules précurseurs des cellules sexuelles subissent une division spéciale nommée méiose qui permet le brassage allélique de l'information génétique.

Plus récemment, on a observé que l'expression des gènes est régulée dans le temps et l'espace. L'épigénétique correspond à « l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence ADN ». Elle regroupe donc un ensemble de facteurs qui modifient l'action des gènes de manière transmissible pour des cellules, des tissus, voire parfois, pour des individus qui peuvent transmettre ces modifications à leur descendance.

De nombreuses observations suggèrent que les expositions environnementales (en particulier durant la gestation), peuvent induire des modifications génétiques ou épigénétiques qui pourront être transmises aux générations suivantes et/ou conduire à des maladies qui se manifesteront plus tard au cours de l'existence.

Effets méiotiques

La méiose est initiée par des cassures double-brins dont la réparation par recombinaison homologue en méiose I va créer les forces nécessaires à la ségrégation des chromosomes, en vue de la réduction haploïde des gamètes matures en méiose II. Ce processus peut être perturbé par l'induction ectopique de cassures double-brins, résultant par exemple d'irradiations, et par toute anomalie génétique ou épigénétique perturbant l'appariement, la recombinaison et la ségrégation des chromosomes homologues.

Les erreurs méiotiques peuvent engendrer une gamme d'effets adverses sur la fertilité : une stérilité complète, des conditions de sub-fertilité, ou la formation de gamètes aneuploïdes susceptibles d'entraîner des avortements spontanés et des phénotypes pathologiques chez la descendance. Pour rappel, il existe un dimorphisme sexuel dans la cinétique méiotique chez les mammifères. Chez la plupart des espèces, les échanges chromosomiques sont en effet initiés en période prénatale chez la femelle et la ségrégation chromosomique s'achève à chaque cycle folliculaire. Chez le mâle, la méiose se déroule pour la première fois à la puberté et sera répétée tout au long de la vie à chaque cycle spermatogénétique. Enfin, il est aussi pertinent de souligner ici que mâles et femelles ne répondent pas de façon identique à des perturbations méiotiques, en raison de l'existence du corpuscule sexuel chez le mâle

(résultant de l'appariement partiel des chromosomes X et Y), qui impose des contrôles plus stringents du déroulement de la méiose (Hunt et Hassold, 2002). Des invalidations génétiques chez la souris ont ainsi montré que les cellules germinales mâles sont beaucoup plus sensibles, et toute mutation de gènes méiotiques engendre en général une azoospermie complète. Chez les femelles, pour des mutations identiques, la gamétogenèse n'est pas perturbée en soi, mais les gamètes produits ont une constitution chromosomique anormale.

Configuration chromosomique

Les études pionnières du groupe de T. Hassold et P. Hunt ont pour la première fois révélé un effet potentiel du BPA sur la méiose, et en particulier sur la méiose femelle dans le modèle murin (Hunt et coll., 2003). Les premières observations sont liées à une exposition accidentelle au BPA de colonies de souris, résultant d'endommagement des containers d'eau par l'utilisation par inadvertance de détergents alcalins pour le nettoyage. Les auteurs ont ainsi rapporté une augmentation drastique du nombre d'alignements chromosomiques anormaux en métaphase I (de 40 % à 1 ou 2 % en situation non exposée) et de cas d'aneuploïdies par non-disjonction chromosomique en métaphase II (de 6 % à 0,7 % en situation non exposée). Le taux d'exposition entraînant ces effets a été estimé par chromatographie de masse à 14-72 µg/kg de masse corporelle par jour. Le protocole expérimental contrôlé a ensuite consisté en une exposition journalière dans l'eau de boisson à 20, 40 et 100 µg/kg de BPA, sur des souris juvéniles de 20 à 22 jours post-partum, pendant 6-8 jours, avant analyse de la configuration chromosomique en métaphase II (ovocytes ovulés). L'étude montre alors un effet dose et durée dépendant de l'exposition au BPA sur l'incidence de figures anormales d'alignement chromosomique, avec une culminance de 10 % à 100 µg/kg pendant 7 jours. Ainsi, l'exposition à faible dose de BPA en phase finale de la méiose, après la naissance, semble induire une augmentation significative d'anomalies d'alignement des chromosomes méiotiques, avec un effet potentiel sur la ploïdie des ovocytes en fin de méiose, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. En effet, les études *in vivo* ne permettent pas de distinguer des effets directs sur l'ovocyte des effets indirects sur les cellules de la granulosa (follicule) ou liés à une perturbation de l'axe neuro-endocrinien.

En 2005, Can et coll. utilisent un modèle de maturation ovocytaire (ovocyte et son follicule) *in vitro* pour tester les effets du BPA à forte dose (10 à 30 µM). Des effets sur la cinétique de progression de la méiose sont observés, en l'absence d'effet sur l'axe neuro-endocrinien, avec perturbation du centrosome et du réseau de microtubules, conduisant à la formation de fuseaux méiotiques anormaux en métaphase I. En 2008, Lenie et coll. reproduisent le même type de protocole expérimental avec les mêmes doses de BPA et montrent que les capacités stéroïdiennes des cellules de la granulosa ne sont pas altérées par le BPA, et que l'effet sur la méiose serait ainsi direct. Ils observent de plus à forte dose de BPA (30 µM) un taux important de défauts d'alignement chromosomique et de déformations du fuseau méiotique en métaphase I, avec un nombre conséquent d'ovocytes arrêtés. Seulement 50 % des ovocytes exposés passent en fait la métaphase I et atteignent le stade de métaphase II, qui est normale. A faible dose, les ovocytes passent sans encombre la métaphase I, progressent en métaphase II mais présentent des anomalies d'alignement chromosomique à ce stade, sans aneuploïdie cependant.

Aneuploïdie

Dans leurs observations initiales d'exposition accidentelle à faible dose de BPA, Hunt et coll. avaient rapporté non seulement des anomalies d'alignement chromosomiques, mais également une augmentation de l'incidence d'aneuploïdies en métaphase II, résultant potentiellement de problèmes de ségrégation chromosomique. Cependant, Eichenlaub-Ritter et coll. revoient cette conclusion en 2008 en utilisant un protocole d'exposition sub-chronique post-natale, avec une administration à faible dose de BPA par voie orale pendant 7 jours, suivie de la maturation *in vitro* d'ovocytes dénudés en absence de BPA. Ils ne retrouvent pas de cas d'hyperploïdies, bien que des problèmes d'alignement en métaphase I soient observés. Dans une étude parallèle, les mêmes auteurs procèdent cette fois avec une étude purement *in vivo* d'exposition à faible dose de BPA, dans des conditions similaires à l'étude originale de Hunt et coll. (Pacchierotti et coll., 2008). Ils n'observent pas d'anomalies du nombre de chromosomes, ni dans les ovocytes en métaphase II, ni dans les zygotes fécondés. Les auteurs concluent que l'exposition au BPA affecte bien l'alignement des chromosomes en métaphase I, mais n'augmente pas le risque d'erreurs en nombre de chromosomes, du fait de l'élimination potentielle en amont des ovocytes anormaux.

Cette même étude inclut également l'analyse de la méiose mâle après exposition postnatale au BPA, à diverses doses pendant 6 jours. Aucun effet sur la cinétique méiotique n'est observé, et il n'existe pas non plus d'augmentation du nombre d'aneuploïdies dans les spermatozoïdes matures analysés 22 jours après cette exposition (en respectant donc la chronologie de progression spermatogénétique de l'entrée en méiose à la production de spermatozoïdes épидидymaires). Il s'agit de la seule étude répertoriée d'analyse des conséquences d'exposition au BPA sur la méiose mâle. Bennetts et coll. (2008) ont plus particulièrement étudié les effets du BPA sur des spermatozoïdes humains purifiés, après exposition *in vitro*. Avec ce protocole simplifié, le BPA s'avère inactif dans l'induction de stress oxydatif, la perturbation du mouvement flagellaire, et l'induction de cassures ADN, alors que d'autres composés œstrogéniques sont positifs sur ces paramètres. Dans cette même perspective, une autre tentative d'étude de la capacité du BPA à induire des cassures ADN a été réalisée *in vitro*, sur des cellules de cancer du sein exprimant le récepteur aux œstrogènes (MCF-7) (Iso et coll., 2006). A forte dose, le BPA a des effets génotoxiques sur ces cellules, mais une concentration 1000 fois supérieure à celle de l'œstrogène E2 est nécessaire pour induire un nombre de cassures similaire.

En résumé, une réponse dose dépendante sur l'organisation des chromosomes en métaphase de méiose I est systématiquement retrouvée dans toutes les études. Cependant, le BPA n'augmenterait pas l'incidence de production d'ovocytes aneuploïdes, du fait du maintien normal de la ségrégation des chromosomes et/ou d'un arrêt précoce des ovocytes trop anormaux. Le phénotype d'aneuploïdie à faible dose de BPA initialement reporté par Hunt et coll., pourrait provenir d'effets synergiques d'exposition non contrôlée à d'autres agents. En effet, la composition en phyto-œstrogènes de l'alimentation semble influencer le taux d'aneuploïdie (Muhlhauser et coll., 2009).

Effets épigénétiques

La régulation épigénétique participe au programme développemental et cellulaire normal. Ainsi, l'engagement vers un programme particulier est initié par divers stimuli, le plus souvent sous forme de signaux tels qu'une molécule développementale, une hormone, un changement de température, l'application de forces physiques... Cette perception de l'environnement extérieur est traduite au sein de la cellule par des voies de signalisation

intracellulaires, qui aboutissent dans le noyau à l'activation ou la répression de gènes cibles, par la liaison de facteurs de transcription. Cette réponse transcriptionnelle est ensuite consolidée par des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications vont assurer la stabilité de la décision cellulaire en l'absence du signal inducteur d'origine, mais également la perpétuation de cette identité aux cellules filles issues de la cellule d'origine qui a été confrontée au signal inducteur. Sans ce verrou final, les décisions développementales seraient labiles et la constitution de tissus homogènes impossibles.

Des anomalies épigénétiques peuvent être la cause ou la conséquence d'une altération d'un programme développemental donné. Un mode d'action épigénétique est suspecté lorsque des perturbations précoces en vie fœtale ou néonatale induisent un phénotype adulte, et/ou induisent des effets multigénérationnels voire transgénérationnels. Ce dernier cas de transmission implique une altération de la lignée germinale. Tout programme de différenciation normal s'accompagne de profils épigénétiques spécifiques et il est notamment bien documenté que les cellules germinales subissent des remaniements importants de leurs profils de méthylation en période fœtale normale, en relation avec le programme de différenciation gonadique et sexuel. Ces cellules ont la particularité d'effacer leurs profils épigénétiques en préparation de l'acquisition de marques spécifiques à la lignée germinale et au sexe de l'individu (Trasler, 2006). Une exposition précoce à des perturbateurs endocriniens est donc susceptible d'altérer les profils transcriptionnels et épigénétiques des organes cibles des androgènes et œstrogènes, et aussi directement ou indirectement la programmation épigénétique de la lignée germinale.

Effets précoces du BPA sur la méthylation de l'ADN à l'âge adulte

La prise de conscience d'un effet potentiel du bisphénol A sur les profils de méthylation de l'ADN provient d'une étude menée en 2007 par Dolinoy et coll. Les auteurs utilisent dans cette étude une lignée de souris porteuse d'un allèle métastable du gène *agouti* contrôlant la couleur du pelage, c'est-à-dire dont le statut de méthylation variable peut être aisément suivi par la couleur du pelage. Des femelles exposées à un régime fortement supplémenté en bisphénol A (50 000 µg/kg/jour) pendant deux semaines avant accouplement et tout au long de la période de gestation et de lactation ont une reproduction normale et une progéniture saine, mais cette dernière présente un excès de couleur jaune de pelage qui signe une surexpression du gène *agouti*. Une hypométhylation du locus est en effet retrouvée, ainsi qu'au niveau d'un autre locus métastable. Cette étude suggérait qu'une exposition prénatale et continue au BPA, au moins à forte dose, pouvait modifier les phénotypes adultes par altération de l'épigénome.

Les effets du BPA en exposition fœtale et/ou néonatale sur la méthylation de l'ADN de tissus somatiques adultes ont été proposés par d'autres études, en utilisant des doses faibles. Tout d'abord, Ho et coll. (2006) rapportent une perte de méthylation au locus *Pde4d4* dans la prostate de rats exposés à 10 µg/kg de BPA à la naissance, en association avec une prédisposition au développement d'hyperplasies prostatiques. Les variations de méthylation reportées sont cependant peu significatives et leur impact *in vivo* sur la transcription de ce gène n'a pas été étudié. De même, Yaoi et coll. (2008) documentent des hypo- et des hyperméthylations à divers loci dans le cerveau antérieur d'embryons à jours 12,5 et 14,5 de gestation, après que leurs mères aient été injectées à partir du jour 0 de gestation avec 20 µg/kg/jour de BPA. Des variations d'expression semblent exister aux loci concernés, mais les différences de méthylation sont peu significatives par rapport à des embryons contrôles. Enfin, plus récemment, des souris femelles exposées *in utero* par injection maternelle de 5 µg/kg de BPA du jour 9 au jour 16 de gestation ont montré un défaut important de

méthylation du gène *Hoxa10* dans l'utérus à l'âge adulte (Bromer et coll., 2010). De plus, cette hypométhylation conduit à une sensibilité accrue aux œstrogènes et une expression augmentée de *Hoxa10*.

Bien que les profils de méthylation n'aient pas été analysés, un nombre d'études rapportent des changements d'expression de gènes clés dans des tissus adultes consécutifs à une exposition fœtale ou néonatale au BPA, qui pourraient signer une programmation épigénétique précoce de phénotypes adultes (Monje et coll. 2007 ; Salian et coll., 2009a ; 2009b). Bien qu'associées à des phénotypes spermatogénétiques et reproducteurs importants chez les mâles (voir plus loin) (Salian et coll., 2009b,c), les deux études menées dans le laboratoire de T. Vanage sont en revanche difficilement concluantes quant à des perturbations d'expression éventuelles. En effet, ces études sont basées sur une analyse immunohistochimique de l'expression de marqueurs clés tels que des protéines de jonction des cellules de Sertoli ou encore de coactivateurs de récepteurs stéroïdiens. Cette approche ne permet pas une estimation quantitative précise et les conclusions quant à ce point sont sujettes à caution. Enfin, il est intéressant de souligner un autre mode potentiel d'altération épigénétique de processus développementaux précoces par le BPA, via les microARNs. A l'issue d'une étude réalisée à l'échelle du génome global, le microARN mir436, reconnu pour ses effets sur la prolifération cellulaire, a été trouvé surexprimé dans deux lignées humaines placentaires différentes exposées à 25 µg/ml pendant 6 jours (Avisar-Whiting et coll., 2010).

Effets multigénérationnels et transgénérationnels d'exposition précoce au BPA

Une transmission multigénérationnelle de phénotypes délétères s'applique aux cas où la génération F1 exposée en période périnatale ainsi que la génération F2 issue de la lignée germinale F1 exposée sont touchées. Des effets transgénérationnels sont évidents à partir de la génération F3, qui n'a été exposée ni au niveau somatique ni au niveau germinale. Cette transmission de phénotype sous-tend une imprégnation irréversible du matériel germinale, dont les effets ségrégent selon des paramètres mendéliens. Si l'absence de mutation génétique est formellement prouvée, il s'agit dans ce cas d'effets épigénétiques transgénérationnels, ou en d'autres termes de transmission de caractères acquis.

En utilisant le modèle rat, Salian et coll. (2009a, b, c) ont rapporté un effet sur la fertilité mâle après exposition néonatale à des doses faibles de BPA du jour 0 au jour 5 ou après exposition périnatale par gavage des mères de jour 12 de gestation à jour 21 après la naissance. Dans ces protocoles, les individus mâles F1 exposés, mais également les animaux F2 et F3 présentent une baisse de la fertilité, associée à une réduction du nombre et de la motilité de leurs spermatozoïdes et une augmentation du nombre d'avortements induits après croisements avec des femelles contrôles. De façon notable, les effets ne s'estompent absolument pas au cours des générations. Les conclusions de cette étude s'opposent donc à l'absence d'effets multigénérationnels et transgénérationnels précédemment publiée par Ema et coll. (2001) et Tyl et coll. (2002).

En conclusion, il existerait un effet direct dose dépendant d'exposition au BPA sur la première division méiotique. Cet effet de dose ne s'applique cependant pas en seconde division méiotique, puisque la concentration la plus faible (3 nM) induit la plus forte incidence en anomalies de métaphase II. La variation dans les protocoles d'exposition, les différences en fond génétique des souris et de régime alimentaire rendent difficile une interprétation définitive sur l'effet d'une exposition au BPA à faible dose en période postnatale sur la méiose femelle. Chez le mâle adulte, l'exposition au BPA pendant 6 jours après la naissance n'affecte pas le processus méiotique, ni la ségrégation des chromosomes méiotiques. Le BPA n'a de plus pas d'effet *in vitro* sur les spermatozoïdes matures. Aucune

étude n'a cependant été conduite concernant des effets sur la méiose après exposition en période foétale, ni chez la femelle, ni chez le mâle.

Des effets transgénérationnels du BPA à faible dose pourraient exister, suite à une exposition en seconde moitié du développement foetal et/ou pendant la période de lactation. Le maintien du phénotype en F3 implique un marquage de la lignée germinale. En l'absence d'investigation du mécanisme moléculaire sous-jacent, il n'est pas possible de conclure entre, d'une part, l'induction par le BPA d'une mutation génétique dans la lignée germinale des individus F1 et donc d'un effet génotoxique ou, d'autre part, une altération des profils épigénétiques ou épimutation, qui serait transmissible et échapperait alors à la vague de reprogrammation épigénétique que connaît normalement la lignée germinale.

BIBLIOGRAPHIE

- AVISSAR-WHITING M, VEIGA K, UHL K, MACCANI M, GAGNE L, et coll. Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod Toxicol* 2010, Apr 24. [Epub ahead of print]
- BENNETTS LE, DE IULIIS GN, NIXON B, KIME M, ZELSKI K, MCVICAR CM, LEWIS SE, AITKEN RJ. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat Res* 2008; **641** : 1-11
- BROMER JG, SAKKAS D, SIANO LJ, BENADIVA CA, PATRIZIO P. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J* 2010, Feb 24
- CAN A, SEMIZ O, CINAR O. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod*.2005; **11** : 389-396
- DOLINOY DC, HUANG D, JIRTLE RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104** : 13056-13061
- EICHENLAUB-RITTER U, VOGT E, CUKURCAM S, SUN F, PACCHIEROTTI F, PARRY J. Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutat Res* 2008, **651** : 82-92
- EMA M, FUJII S, FURUKAWA M, KIGUCHI M, IKKA T, HARAZONO A. Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol*, 2001 **15** : 505-523
- HO SM, TANG WY, BELMONTE DE FRAUSTO J, PRINS GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; **102** : 134-138
- HUNT P, HASSOLD T. Sex matters in meiosis. *Science* 2002, **296** : 2181-2183
- HUNT PA, KOEHLER KE, SUSIARJO M, HODGES CA, ILAGAN A, VOIGT RC, THOMAS S, THOMAS BF, HASSOLD TJ. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 2003; **13** : 546-553
- ISO T, WATANABE T, IWAMOTO T, SHIMAMOTO A, FURUICHI Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull* 2006, **29** : 206-10
- LENIE S, CORTVRINDT R, EICHENLAUB-RITTER U, SMITZ J. Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutat Res* 2008, **651** : 71-81
- MONJE L, VARAYOUD J, LUQUE EH, RAMOS JG. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol* 2007, **194** : 201-212
- MUHLHAUSER A, SUSIARJO M, RUBIO C, GRISWOLD J, GORENCE G, HASSOLD T, HUNT PA. Bisphenol A effects on the growing mouse oocyte are influenced by diet. *Biol Reprod* 2009, **80** : 1066-1071

PACCHIEROTTI F, RANALDI R, EICHENLAUB-RITTER U, ATTIA S, ADLER ID. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. *Mutat Res* 2008, 651 : 64-70

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sci.* 2009a, 85 : 11-18

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology.* 2009b, 265 : 56-67

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 2009 c, 85 : 742-752

TRASLER JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev* 2006, 18 : 63-69

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002, 68 : 121-146

YAOI T, ITOH K, NAKAMURA K, OGI H, FUJIWARA Y, FUSHIKI S. 1.Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Brain Dev* 2007, 29 : 352-356

7

Mécanismes d'action

Le bisphénol A (BPA) est un agoniste faible des œstrogènes pouvant se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β ($ER\alpha$ et β) et activer une réponse qui a été largement considérée comme la source de ses « effets » indésirables dans (certaines) études animales. Cependant, le BPA présente plusieurs milliers de fois moins d'affinité pour $ER\alpha$ et β que l'œstradiol. Certaines études *in vitro* ont montré également que le BPA a des effets anti-androgéniques et peut se lier au récepteur des androgènes (AR) (Sun et coll., 2006), mais les preuves d'effets antiandrogéniques *in vivo* chez l'animal sont rares ou absentes (Kobayashi et coll., 2002; Tyl et coll., 2002; Howdeshell et coll., 2008). Plus récemment, des liaisons du BPA à d'autres récepteurs nucléaires ou membranaires ont été démontrées.

Récepteurs nucléaires des œstrogènes alpha et beta

Le BPA avec ses deux noyaux phénoliques a un mode de liaison à $ER\alpha$ et β similaire à celui de l'œstradiol (E2). Cependant son affinité est 10 000 fois plus faible que celle de l'œstradiol et est similaire pour les deux récepteurs (Kuiper et coll., 1998).

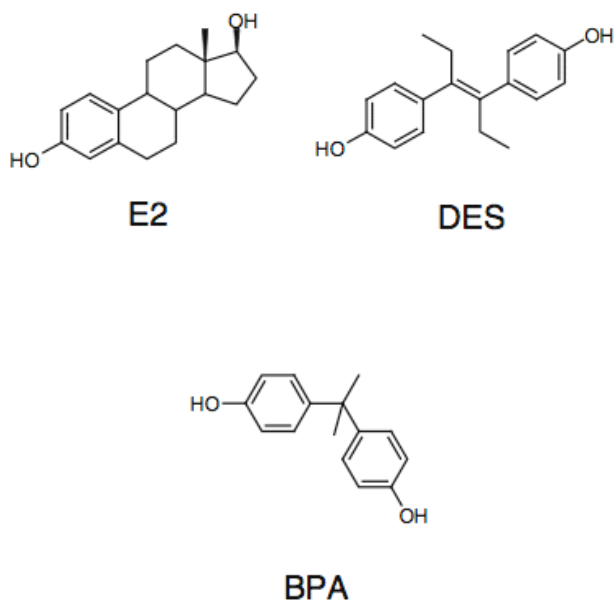


Figure 1 : Structures chimiques de l'œstradiol (E2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A (BPA)

Le BPA est considéré comme un *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM). Les SERM sont souvent des molécules à activité agoniste partielle. Cette activité varie selon le promoteur du gène étudié, selon le contexte cellulaire (*in vitro*) ou l'organe considéré (*in vivo*). Cet agonisme

partiel a été étudié par Gould (Gould et coll., 1998) qui a par exemple montré qu'*in vitro* le BPA est moins actif que E2 sur ER α délété de son domaine d'activation constitutive AF-1. Les travaux de Sumpter (Routledge et coll., 2000) ont montré que le recrutement de co-facteurs transcriptionnels différait entre E2 et BPA. Enfin, en lien avec cette activité d'agoniste partiel, certaines réponses *in vivo* de l'œstradiol dans l'utérus de souris ne sont pas observées avec le BPA comme l'augmentation du poids de l'utérus alors que d'autres sont maintenues comme une activité peroxydase ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur de la progestérone (Gould et coll., 1998). Ces résultats ont été confortés par les travaux de Nagel qui ont montré qu'un traitement au BPA augmentait peu la croissance utérine et en revanche activait l'expression d'un gène rapporteur (Nagel et coll., 2001). Au contraire, d'autres SERM comme l'hydroxy-tamoxifène utilisé pour le traitement du cancer du sein est actif sur la croissance utérine et sans effet sur l'activation du gène rapporteur. Le fait que le BPA soit un SERM peut expliquer pourquoi certaines études n'ont pas pu montrer d'effets *in vivo* de ce composé. Ainsi, le BPA a à peu près les mêmes effets que E2 au niveau de la prostate de fœtus murins (Timms et coll., 2005). En revanche, ces effets diffèrent beaucoup de celui de E2 dans l'utérus (Markey et coll., 2001).

Enfin la faible affinité du BPA pour ER α et β ne permet pas d'expliquer les effets observés à faible dose à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, certaines études ont montré des réponses au BPA qui suivent des courbes non monotones et qui ne peuvent pas être expliquées par une action sur un seul type de récepteur. C'est pour ces raisons que plusieurs groupes de scientifique ont cherché à identifier d'autres médiateurs des effets du BPA. La liaison du BPA avec des affinités variées à plusieurs récepteurs ayant des actions différentes pourrait expliquer d'une part des effets à faible dose (plus faible que celle permettant la liaison à ER α et β) et d'autre part des effets particuliers suivant la dose. Les différents récepteurs pouvant médier les effets du BPA sont décrits ci-dessous.

Récepteurs des œstrogènes membranaires

Des études récentes ont montré que le BPA pouvait d'une part avoir des effets à des concentrations plus faibles que celles auxquelles il se lie à ER α et β et d'autre part agir très rapidement (quelques minutes) ce qui exclut une action médiée par des récepteurs nucléaires. Des effets dits « non génomiques » pourraient faire intervenir des récepteurs localisés dans le cytoplasme, dans la mitochondrie ou dans la membrane cytoplasmique. Deux types de récepteurs ont été décrits.

Les premiers pourraient être des formes membranaires de ER α et β (mER α et β). La localisation à la membrane de ces récepteurs n'est pas clairement expliquée mais elle pourrait être due à des modifications post-traductionnelles comme la palmitoylation (Hammes et coll., 2007). Le groupe de Watson a proposé que le BPA pourrait médier une partie des effets par ce type de récepteurs (Watson et coll., 2007a et b, 2010). Les auteurs ont montré que le BPA à des doses très faibles (1 picomolaire) induisait rapidement (en moins d'une minute) l'augmentation de calcium intracellulaire puis la sécrétion de prolactine dans la lignée pituitaire GH3/B6. Ces réponses ne peuvent pas être représentées par une courbe monotone. Egalement observées avec E2, ces effets sont inhibés par un co-traitement avec du fulvestrant (un anti-œstrogène). L'augmentation de calcium intracellulaire à des doses faibles de BPA (0,1-1 nM) a également été observée dans des cellules pancréatiques (Quesada et coll., 2002) ainsi que dans la lignée de cancer du sein MCF-7 (Walsh et coll., 2005). La liaison à des récepteurs des œstrogènes membranaires permet d'expliquer certains des effets rapides (ou non génomiques) du BPA. En revanche, elle ne permet pas d'expliquer les effets à faible

concentration. En effet, il est supposé que ces formes membranaires ont la même affinité pour le BPA que les formes nucléaires.

Un deuxième médiateur des effets non génomiques du BPA pourrait être le récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, GPR30. Ce récepteur différent des récepteurs nucléaires des œstrogènes est localisé dans le réticulum endoplasmique et il pourrait lier le BPA à faible concentration. Les travaux du groupe de Fénichel (Bouskine et coll., 2008, 2009) ont montré que le BPA stimulait la prolifération des cellules testiculaires JKT-1. Cet effet est observable aux faibles doses (1 picomolaire) et s'atténue aux fortes doses (courbe en U inversé). Une augmentation de la prolifération des cellules testiculaires JKT-1 est également observée avec de l'œstradiol couplé à de la BSA (dans ce cas, l'œstradiol ne peut pas pénétrer dans la cellule) alors qu'une inhibition est observée avec l'œstradiol non couplé à la BSA. Les cellules testiculaires JKT-1 expriment GPR30 et le récepteur nucléaire des œstrogènes ER β . ER β contrairement au récepteur nucléaire ER α inhibe généralement la prolifération cellulaire (Hartmann et coll., 2006, Williams et coll., 2008). Dans cette étude, les auteurs proposent que le BPA à faibles concentrations (inférieures au nM) active la prolifération à travers GPR30. En revanche, à fortes concentrations (> 1 nM), le BPA se lie également à ER β , qui ayant une action antiproliférative bloquerait les effets activateurs de GPR30 sur la croissance cellulaire. Ainsi E2 qui se lie avec une bonne affinité aux deux récepteurs (ER β et GPR30) est plutôt antiprolifératif. Au contraire, l'œstradiol modifié ne pouvant pas pénétrer dans la cellule (couplé à la BSA) se lie à GPR30 et présente un effet prolifératif. Cette étude illustre bien comment le BPA peut exercer des effets différents en fonction de sa concentration. Il agirait sur au moins deux récepteurs (ici GPR30 et ER β) en se liant avec des affinités différentes (fortes pour GPR30, faible pour ER β) qui ont des actions opposées sur une même réponse cellulaire (ici la prolifération).

Le rôle de GPR30 dans la prolifération cellulaire a été confirmé par d'autres études comme celles du groupe de Maggiolini (Albanito et coll., 2007, Sirianni et coll., 2008). Ces travaux ont montré dans la lignée spermatogonique GC-1 que E2 ou un ligand sélectif de GPR30 (ligand G1) activait la prolifération cellulaire par un mécanisme non génomique (Sirianni et coll., 2008). Cette équipe a également montré que GPR30 pouvait médier certains des effets de E2 dans des lignées de cancer de l'ovaire ou du sein ER alpha positives ou négatives (Albanito et coll., 2007).

Le rôle de GPR30 dans l'effet de E2 ou du BPA n'est cependant pas admis par l'ensemble de la communauté scientifique. Le groupe d'Otto notamment s'oppose vivement à l'hypothèse que GPR30 puisse médier des effets œstrogéniques (Otto et coll., 2008, 2009 ; Langer et coll., 2010). Cette équipe a montré *in vitro* que GPR30 ne liait pas E2, que le ligand spécifique de GPR30, G-1 n'induisait pas de réponses œstrogéniques. De plus, leurs études *in vivo* ont montré que les souris déficientes en GPR30 (GPR30 $^{-/-}$) ne présentait pas d'anomalies au niveau du développement des organes cibles de la reproduction (ovaires, utérus, glandes mammaires), de problèmes de fertilité ni de perturbation des réponses œstrogéniques dans l'utérus ou dans la glande mammaire.

Malgré cette contreverse, ces résultats indiquent que des effets rapides ou non génomiques du BPA pourraient être médiés par des formes membranaires de récepteurs aux œstrogènes. Le médiateur de ces effets pour les faibles concentrations n'est pas identifié de façon certaine. Les récepteurs membranaires ER α et β sont supposés avoir la même affinité que leurs équivalents nucléaires et l'interaction entre GPR30 et bisphénol A (ainsi qu'avec E2) n'a pas pu être démontré par des techniques biochimiques classiques. L'identification récente de ligands agonistes (Revankar et coll., 2005) et antagonistes (Dennis et coll., 2009) de GPR30 ne se liant pas aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β et l'étude des effets de ces

molécules dans davantage de modèles cellulaires (exprimant ou pas ER α , ER β nucléaire et membranaire et GPR30) permettra certainement de répondre à ces questions.

Récepteur des androgènes (AR)

Les autres hypothèses pouvant expliquer les effets faibles doses ainsi que les effets non monotones du BPA sont sa liaison à d'autres types de récepteurs nucléaires. Plusieurs études ont montré que le BPA se liait au récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Sohoni et coll., 1998, Paris et coll., 2002, Lee et coll., 2003, Xu 2005, Li 2010). Contrairement aux ERs, le BPA est un antagoniste pour AR et son affinité est de l'ordre du micromolaire. Les effets observés à faible dose pourraient en partie s'expliquer par des action synergiques à travers les récepteurs ERs (action agoniste et féminisante) et le récepteur AR (action antagoniste donc antagoniste de l'effet masculinisant). D'autre part, il est à noter que le BPA a une activité agoniste à faibles concentrations (1 à 10 nanomolaire) sur une forme mutée de AR (AR-T877A) associée à des cancers de la prostate résistants aux anti-androgènes (Wetherill et coll., 2002, 2005).

Récepteur relié aux œstrogènes gamma (ERR gamma)

Très récemment, le BPA a également été identifié comme un ligand du récepteur ERR γ (Abad et coll., 2008 ; Okada et coll., 2008 ; Li et coll., 2010). Son affinité est de l'ordre de 5 nanomolaire. ERR γ est un récepteur constitutivement activé qui est légèrement activé par le BPA. Bien que les fonctions physiologiques de ERR γ ne soient pas bien connues, le fait que ERR γ puisse se lier sur les mêmes promoteurs de gènes que les récepteurs des œstrogènes (Vanacker et coll., 1999) pourrait expliquer en partie les effets de perturbation endocrine du BPA.

Liaison à d'autres récepteurs nucléaires potentiellement non impliqués dans les effets reprotoxiques du BPA

Des études ont montré que des dérivés halogénés du BPA, le tétra bromo-BPA (TBBPA) et le tétra chloro-BPA (TCBPA) (mais pas le BPA) se liaient aux récepteurs des hormones thyroïdiennes (Kitamura et coll., 2002). Cette étude a également montré que comme l'hormone thyroïdienne T3, le TBBPA et le TCBPA avaient un effet activateur sur la prolifération des cellules pituitaires GH3. Curieusement, l'étude de Sun a plutôt classé ces dérivés comme ayant un effet antagoniste (Sun et coll., 2009) dans un test de gènes rapporteurs. Il faut souligner que ces effets (anti)thyroïdiens ne sont observés qu'à fortes concentrations (de 1 à 10 μ M).

Les mêmes dérivés halogénés du BPA (Balaguer communication personnelle) ainsi que le BADGE (Seimandi et coll., 2005, Wright et coll., 2000) sont des ligands du récepteur PPAR γ (Balaguer communication personnelle) avec une affinité de l'ordre du μ M. De nombreuses études ont établi un lien entre exposition au BPA et obésité (Rubin et coll., 2001, Masuno et coll., 2005, Miyawaki et coll., 2007, Somm et coll., 2009). Ces effets pourraient être médiés par PPAR γ et être dus au BPA ou à un de ses métabolites. Dans l'étude de Kwintkiewicz (2010), il est à noter que le BPA induit l'expression de PPAR γ . Cependant cet effet est observable uniquement à forte concentration (1 à 100 μ M).

Enfin, le BPA a été identifié comme étant capable d'activer les récepteurs RXRs dans un test de gène rapporteur incluant du métabolisme (Li et coll., 2008) et d'augmenter l'expression du récepteur nucléaire Nur77 (Song et coll., 2002, Ahn et coll., 2008,) qui est impliqué dans la stéroïdogénèse.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats indiquent que le bisphénol A et/ou des molécules dérivées sont capables de se lier à différents récepteurs nucléaires ou membranaires. Les affinités de liaison ne sont pas très fortes (excepté pour GPR30 si l'interaction est confirmée) mais des synergies d'action entre récepteurs nucléaires (récepteurs ER α , ER β et AR) peuvent expliquer des effets à faible dose. D'autre part, le fait que le BPA se lie à des formes membranaires des récepteurs des œstrogènes indique qu'il pourrait également se lier à des formes membranaires d'autres récepteurs nucléaires comme AR (Bonaccorsi et coll., 2008) ou TR α ou β (Iordanidou et coll., 2010).

BIBLIOGRAPHIE

ABAD MC, ASKARI H, O'NEILL J, KLINGER AL, MILLIGAN C, LEWANDOWSKI F et coll. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, **108** : 44-54

AHN SW, NEDUMARAN B, XIE Y, KIM DK, KIM YD, CHOI HS. Bisphenol A bis(2,3-dihydroxypropyl) ether (BADGE.2H₂O) induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and increases steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Mol Cells* 2008, **26** : 74-80

ALBANITO L, MADEO A, LAPPANO R, VIVACQUA A, RAGO V, et coll. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007, **67** : 1859-1866

BONACCORSI L, NOSI D, QUERCIOLO F, FORMIGLI L, ZECCHI S, MAGGI M, FORTI G, BALDI E Prostate cancer : a model of integration of genomic and non-genomic effects of the androgen receptor in cell lines model. *Steroids* 2008, **73** : 1030-1037

BOUSKINE A, NEBOUT M, BRÜCKER-DAVIS F, BENAHMED M, FENICHEL P Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1053-1058

BOUSKINE A, NEBOUT M, MOGRABI B, BRÜCKER-DAVIS F, ROGER C, FENICHEL P Estrogens promote human testicular germ cell cancer through a membrane-mediated activation of extracellular regulated kinase and protein kinase A. *Endocrinology* 2008, **149** : 565-573

DENNIS MK, BURAI R, RAMESH C, PETRIE WK, ALCON SN et coll. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* 2009, **5** : 421-427

GOULD JC, LEONARD LS, MANESS SC, WAGNER BL, CONNER K et coll. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1998, **142** : 203-14

HAMMES S, LEVIN E. Extranuclear steroid receptors : nature and actions. *Endocr Rev* 2007, **28** : 726-41

HARTMAN J, LINDBERG K, MORANI A, INZUNZA J, STRÖM A, GUSTAFSSON J. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006, **66** : 11207-11213

HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, WILSON VS, RYAN BC, et coll. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci* 2008, **102** : 371-382

- IORANIDOU A, HADZOPOULOU-CLADARAS M, LAZOU A Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes : relevance to gene expression and cell growth. *Mol Cell Biochem* 2010 In press
- KITAMURA S, JINNO N, OHTA S, KUROKI H, FUJIMOTO N Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293** : 554-559
- KOBAYASHI K, MIYAGAWA M, WANG RS, SEKIGUCHI S, SUDA M, et coll. Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring. *Ind Health* 2002, **40** : 375-381
- KUIPER G, LEMMEN J, CARLSSON B, CORTON J, SAFE S, VAN DER SAAG P, VAN DER BURG B, GUSTAFSSON J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998, **139** : 4252-4263
- KWINTKIEWICZ J, NISHI Y, YANASE T, GIUDICE LC. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Mediates the Endocrine Disrupter Bisphenol A Inhibition of FSH-stimulated IGF-I, Aromatase and Estradiol in Human Granulosa Cells. *Environ Health Perspect* 2009, **epub 22 octobre 2010** : 1-39
- LANGER G, BADER B, MEOLI L, ISENSEE J, DELBECK M, NOPPINGER PR, OTTO C. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids* 2010, In Press
- LEE HJ, CHATTOPADHYAY S, GONG EY, AHN RS, LEE K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 2003, **75** : 40-46
- LI J, MA M, WANG Z. A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on retinoid X receptor-mediated gene expression. *Toxicol Lett* 2008, **176** : 198-206
- LI J, MA M, WANG Z. In vitro profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicol In Vitro* 2010, **24** : 201-207
- MARKEY CM, MICHAELSON CL, VESON EC, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. The mouse uterotrophic assay : a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 55-60
- MASUNO H, IWANAMI J, KIDANI T, SAKAYAMA K, HONDA K. Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci* 2005, **84** : 319-327
- MIYAWAKI J, SAKAYAMA K, KATO H, YAMAMOTO H, MASUNO H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice *J Atheroscler Thromb* 2007, **14** : 245-252
- NAGEL SC, HAGELBARGER JL, MCDONNELL DP Development of an ER action indicator mouse for the study of estrogens, selective ER modulators (SERMs), and Xenobiotics. *Endocrinology* 2001, **142** : 4721-4728
- OKADA H, TOKUNAGA T, LIU X, TAKAYANAGI S, MATSUSHIMA A, SHIMOHIGASHI Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 32-38
- OTTO C, FUCHS I, KAUSELMANN G, KERN H, ZEVNIK B et coll. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 2009, **80** : 34-41
- OTTO C, ROHDE-SCHULZ B, SCHWARZ G, FUCHS I, KLEWER M et coll. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 2008, **149** : 4846-4856
- PARIS F, BALAGUER P, TEROUANNE B, SERVANT N, LACOSTE C et coll. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002, **193** : 43-49
- QUESADA I, FUENTES E, VISO-LEON MC, SORIA B, RIPOLL C, et coll. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* 2002, **16** : 1671-1673

- REVANKAR CM, CIMINO DF, SKLAR LA, ARTERBURN JB, PROSSNITZ ER A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005, **307** : 1625-1630
- ROUTLEDGE EJ, WHITE R, PARKER MG, SUMPTER JP. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *J Biol Chem* 2000, **275** : 35986-35993
- RUBIN BS, MURRAY MK, DAMASSA DA, KING JC, SOTO AM Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 675-680
- SEIMANDI M, LEMAIRE G, PILLON A, PERRIN A, CARLAVAN I, VOEGEL JJ, VIGNON F, NICOLAS JC, BALAGUER P Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands *Anal Biochem* 2005, **344** : 8-15
- SIRIANNI R, CHIMENTO A, RUGGIERO C, DE LUCA A, LAPPANO R, ANDÒ S, MAGGIOLINI M, PEZZI V The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* 2008, **149** : 5043-5051
- SOHONI P, SUMPTER JP Several environmental estrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 1998, **158** : 327-339
- SOMM E, SCHWITZGEBEL VM, TOULOTTE A, CEDERROTH CR, COMBESURE C, NEF S, AUBERT ML, HÜPPI PS Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1549-1555
- SONG KH, LEE K, CHOI HS. Endocrine disrupter bisphenol a induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology* 2002, **143** : 2208-2215
- SUN H, SHEN OX, WANG XR, ZHOU L, ZHEN SQ, CHEN XD Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicol In Vitro* 2009, **23** : 950-954
- SUN H, XU LC, CHEN JF, SONG L, WANG XR. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food Chem Toxicol* 2006, **44** : 1916-1921
- TIMMS BG, HOWDESHELL KL, BARTON L, BRADLEY S, RICHTER CA, VOM SAAL FS :Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, **102** : 7014-7019
- TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146
- VANACKER JM, PETTERSSON K, GUSTAFSSON JA, LAUDET V Transcriptional targets shared by estrogen receptor- related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ER beta. *EMBO J* 1999, **18** : 4270-4279
- WALSH DE, DOCKERY P, DOOLAN CM Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on [Ca²⁺]_i in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005, **230** : 23-30
- WATSON CS, ALYEA RA, JENG YJ, KOCHUKOV MY Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2007a, **274** : 1-7
- WATSON CS, BULAYEVA NN, WOZNIAK AL, ALYEA RA. Xenestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* 2007b, **72** : 124-134
- WATSON CS, JENG YJ, KOCHUKOV MY Nongenomic Signaling Pathways of Estrogen Toxicity. *Toxicol Sci* 2010, In Press

WETHERILL YB, FISHER NL, STAUBACH A, DANIELSEN M, DE VERE WHITE RW, KNUDSEN KE Xenoestrogen action in prostate cancer : pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res* 2005, **65** : 54-65

WETHERILL YB, PETRE CE, MONK KR, PUGA A, KNUDSEN KE. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2002, **1** : 515-524

WILLIAMS C, EDVARDSSON K, LEWANDOWSKI SA, STRÖM A, GUSTAFSSON JA A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 2008, **27** : 1019-1032

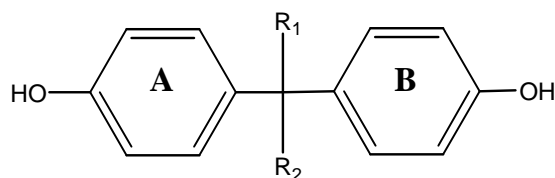
WRIGHT HM, CLISH CB, MIKAMI T, HAUSER S, YANAGI K, HIRAMATSU R, SERHAN CN, SPIEGELMAN BM A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2000, **275** : 1873-1877

XU LC, SUN H, CHEN JF, BIAN Q, QIAN J, et coll. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 2005, **216** : 197-203

8

Relation structure-fonction

La structure chimique d'une classe de perturbateurs endocriniens (ER), les diphenylalcanes hydroxylés ou bisphénols (BP), ayant une activité œstrogénique (œstrogéno-mimétique) significative, est composée par deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone. La structure du bisphénol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane en nomenclature IUPAC), composé le plus connu de cette famille, est représentée en figure 1.



R ₁	R ₂	
CH ₃	CH ₃	Bisphénol A
H	H	Bisphénol F
CF ₃	CF ₃	Bisphénol AF
H	CH ₃	Bisphénol E
CH ₂ CH ₃	CH ₃	Bisphénol B

Figure 1 : Formule semi-développée des bisphénols

Ces molécules interagissent avec les mêmes récepteurs (ER α , ER β ou ERR γ) que les œstrogènes naturels comme l'œstradiol (E2) (Agatonovic-Kustrin, et Turner, 2008). Par différence avec l'œstradiol, la structure d'un récepteur cristallisé avec le BP n'a pas été résolue par analyse aux Rayons X. Cependant, des études expérimentales et/ou théoriques ont mis en évidence différents types d'interactions substrat (BP)/récepteur, mettant en œuvre soit des analogies avec E2 (groupements hydrophobes, hydrophiles, accepteurs/donneurs de liaison H), soit des simulations atomistiques. Ces études ont conduit à des relations bien définies entre les caractéristiques structurales et l'activité biologique (souvent *in vitro*) de cette classe de BP.

En effet, la partie 66-Kd du récepteur ER se compose de trois domaines structurellement distincts : un domaine N-terminal de liaison à l'ADN, un domaine N-terminal et un domaine C-terminal formant une poche hydrophobe (Brzozowski, et coll., 1997 ; Tanenbaum et coll., 1998). Cette cage tridimensionnelle est composée de plusieurs sites de liaison non spécifiques sur lesquels peuvent se loger l'œstrogène ainsi que d'autres ligands (figure 2). Avec un volume de 440 Å³, la poche de liaison est beaucoup plus grande qu'une molécule d'œstrogène, occupant à elle seule un volume de 245 Å³ (pour E2). Ce volume vide est construit à l'aide de résidus non polaires lui conférant la capacité à se lier avec une grande

variété de ligands dont la structure prend en compte un groupement phénol, discriminant retrouvé sur la molécule d'œstrogène.

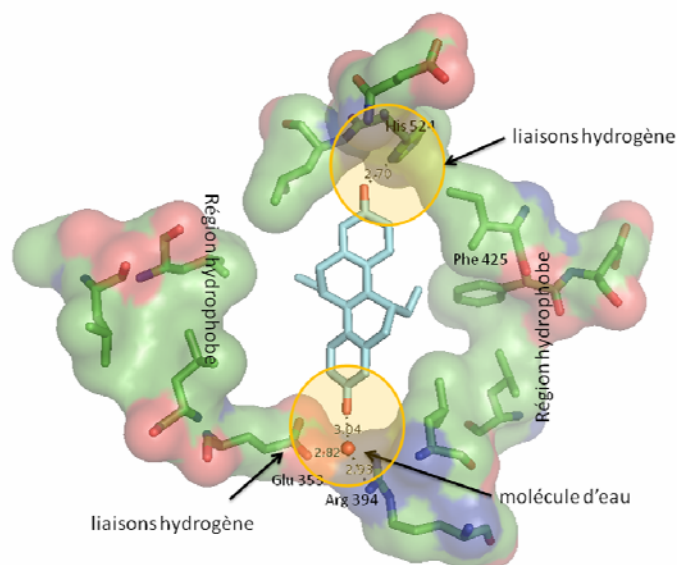


Figure 2 : Structure à rayons X de la poche hydrophobe du ER α avec le substrat naturel 17 β œstradiol (E2) (Brzozowski, et coll., 1997 ; Tanenbaum et coll., 1998).

Études *in-silico*

Au cours de ces dernières années, un grand nombre de travaux portant sur des méthodes QSAR ont été dédiés à l'étude des interactions de ligands non stéroïdiens avec le récepteur ER. Le BPA et ses dérivées ont fait l'objet de quelques travaux spécifiques (Coleman et coll., 2003) mais sont le plus souvent inclus dans le jeu d'entraînement ou de validation des modèles QSAR (Gao et coll., 1999 ; Shi et coll., 2001 ; Waller, 2004 ; Devillers et coll., 2006 ; Kadowaki et coll., 2007 ; Liu et coll., 2007 ; Roncaglioni et coll., 2008a et b). Il faut toutefois souligner que dans la plupart de ces travaux, le critère d'évaluation est l'affinité de liaison au récepteur, absolue (*binding affinity*, BA) ou relative au ligand naturel E2 (*relative binding affinity*, RBA). Des critères d'évaluation plus complexes sont rarement considérés (Coleman et coll., 2003, Roncaglioni et coll., 2008a).

Les jeux d'entraînements sont généralement composés de plusieurs centaines de molécules, mais les jeux de validation sont souvent plus petits (une centaine de molécules), sauf dans quelques cas particuliers (Liu et coll., 2007). Ces modèles permettent la détermination qualitative et/ou quantitative de l'activité œstrogénique en termes d'affinité. Des accords allant jusqu'à 90 % ont été obtenus sur des modèles qualitatifs fournissant une réponse binaire, de type active ou non active (Liu et coll., 2007). Les modèles quantitatifs, plus complexes, présentent également de très bonnes corrélations ($R^2 > 0,90$) en ce qui concerne l'affinité avec les ER, et des pouvoirs prédictifs ($q^2 > 0,6$) pour de très grands ensembles de ligands de structures extrêmement variées (Shi et coll., 2001).

Une amélioration significative a été apportée en couplant les modèles QSPR traditionnels avec des approches de type « docking » et *ab-initio*.

Dans ce cas, le modèle se caractérise par une excellente corrélation ($R^2 = 0,991$) et une très bonne prédictivité ($q^2 = 0,92$) (Sippl et coll., 2000).

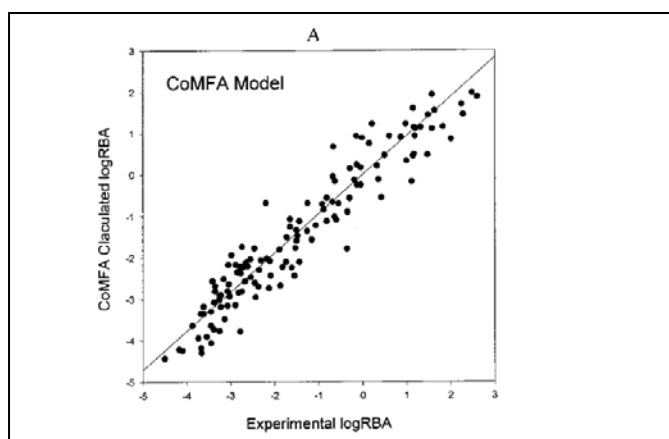


Figure 3 : Exemple d'une corrélation linéaire ($R^2=0.91$) entre l'affinité de liaison relative à E2 (*relative binding affinity*) calculée et expérimentale (Shi et coll., 2001).

Malheureusement, seul un ensemble restreint de molécules (30) a été considéré, et ceci principalement à cause des limitations informatiques. A noter aussi des travaux de type QSAR traditionnel effectués dans le cadre des normes réglementaires OCDE (Tong et coll., 2003 ; Liu et coll., 2006 ; Jensen et coll., 2008). Ces modèles ont également permis d'identifier les principales caractéristiques structurales nécessaires lors de l'interaction ligand récepteur. Néanmoins, des informations plus détaillées sur les interactions microscopiques entre le ligand et l'ER peuvent être déterminées en combinant des approches expérimentales dans lesquelles plusieurs ligands sélectivement modifiés sont testés à l'aide de modèles QSAR, de docking ou d'atomistique. En particulier, l'étude des interactions ligand-ER portant sur des modèles de chimie quantique a montré que l'énergie d'interaction théorique et l'affinité déterminée de façon expérimentale sont bien corrélées (Fukuzawa et coll., 2005). Ces modèles donnent non seulement des informations sur les mécanismes sous-jacents, mais également une relation linéaire ($R>0,8$) entre l'énergie d'interaction calculée et l'activité expérimentale. Le croisement des données théoriques avec les informations expérimentales a permis l'individualisation des caractéristiques structurales du ligand (Kadowaki et coll., 2007).

Relation structure-fonction

Les ERs peuvent lier un nombre important de molécules structurellement différentes. Les caractéristiques principales de leurs ligands naturels (stéroïdes) relèvent de la présence d'un groupement aromatique hydroxylé (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe (Anstead, et coll., 1997; Fang et coll., 2001). Ces caractéristiques essentielles pour l'activité œstrogénique se retrouvent également dans les BP, molécules caractérisées par un cycle aromatique porteur d'un groupement hydroxyle (cycle A, figure 1) et éventuellement substituée en position para. La structure à cycles condensés, retrouvée dans le cas de E2 n'est par conséquent pas nécessaire pour obtenir une activité œstrogénique en terme de prolifération des cellules de cancer du sein humaines MCF-7 (Dodds et Lawson, 1936; Perez et coll., 1998), et peut même donner lieu à des composés non actifs comme les dérivés naphtols (Soto et coll., 1995). La présence du groupement hydroxyle est fondamentale dans l'activité œstrogénique. En effet, l'élimination d'un groupement OH conduit au 4- α -cumylphénol ($\text{HOC}_6\text{H}_4\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_5$), composé ayant une affinité de liaison (*binding affinity*) avec le récepteur égale à celle du BPA, alors que l'élimination du second OH, donne lieu au composé 2,2-diphénylpropane ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_5$), molécule complètement inactive (vis-à-vis du récepteur $\text{ERR}\gamma$) (Okada et coll., 2008).

La présence d'un second groupement fonctionnel à base d'oxygène (hydroxyle, cétone, ou carbonyle), positionné sur la partie terminale de la molécule, en opposition au cycle phénolique, confère ou du moins augmente l'activité œstrogénique (cellules MCF7) (Perez et coll., 1998). Le BPA et le bisphénol F (BPF, 4,4'-Méthylbisphénol) tous deux porteurs de deux groupements OH, ou le bisphénol A diméthacrylate (BIS-DMA) et le bisphénol-A-bis chloroformate (BPACF) ont montré une activité œstrogénique lors des tests de prolifération et d'induction protéique (Perez et coll., 1998).

Par analogie avec E2, ces deux groupements sont nécessaires pour établir deux interactions liantes de type liaison H à l'intérieur de la poche de E2 (voir figure 2) avec d'un côté, une molécule d'eau, de Glu353 et de Arg394, et de l'autre, une molécule de His 524 (Brzozowski, et coll., 1997 ; Tanenbaum et coll., 1998). Néanmoins la présence et la distance entre ces deux groupements hydroxyles ne sont pas les seuls facteurs critiques. En particulier, la nature des substituants liés au pont carbone peut déterminer l'activité œstrogénique. Par exemple, la substitution des groupements méthyles positionnés sur ce dernier, par des groupements hydrophiles provoque une baisse de l'activité œstrogénique, causée par la diminution de la force d'interaction avec la partie hydrophobe du récepteur (Kitamura et coll., 2005). Une autre expérience a montré que le remplacement des groupements CH₃ par des groupements CF₃, donnant lieu au bisphénol AF (BAF, 2,2-Bis(4-hydroxyphényl) hexafluoropropane), induit une baisse de l'activité, causée par la diminution de la force d'interaction hydrophobe avec le cycle aromatique d'un résidu phénylalanine (probablement Phe-425, voir figure 2) (Okada et coll., 2008). En revanche, le remplacement des deux groupements méthyles par des chaînes propylées accroît l'expression des gènes et des protéines (Perez et coll., 1998).

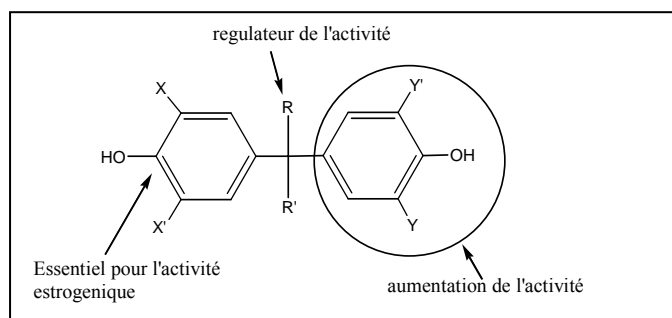


Figure 4 : Représentation des relations entre structure et propriétés pour le bisphénol

L'importance du cycle benzénique B peut être évaluée en le remplaçant par des groupements alkyles. En effet, sa substitution par des groupements méthyles ou éthyles dérivés (4-tert-butylphénol et 4-tert-amylphénol) se matérialise par une baisse significative de l'activité, devenant ainsi inférieure à celle du 4- α -cumylphénol. Pour des chaînes non volumineuses, l'interaction reste toutefois marquée (Okada et coll., 2008). Par conséquent, la présence d'un cycle aromatique suggère une interaction de type π - π ou XH- π (X=N,O,C) avec la poche du récepteur, interaction absente dans le cas de substituants alkyles. Enfin, la présence de substituants chlorés en position 3 ou 5 sur le cycle A a également un effet significatif sur l'activité, et permet de renforcer l'affinité de liaison avec le récepteur (Liu et coll., 2007). En effet, des dérivés chlorés peuvent se former lors du recyclage du papier thermique (par blanchissage à l'hypochlorite de sodium) qui sont 28 fois plus œstrogéniques que le BPA (Fukazawa et coll., 2002). Les requis structuraux sont résumés dans la figure 4.

En conclusion, les bisphénols interagissent avec les mêmes récepteurs (ER α , ER β ou ERR γ) que les œstrogènes naturels comme l'œstradiol (E2). Des études ont montré qu'il existe des relations bien définies entre les caractéristiques structurales et l'activité biologique des bisphénols. Des modèles QSAR permettent la détermination qualitative et/ou quantitative de l'activité œstrogénique en termes d'affinité et donnent des informations sur les mécanismes sous-jacents.

La présence d'un groupement aromatique hydroxylé (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe, caractéristiques essentielles pour l'activité œstrogénique, se retrouvent dans les bisphénols. La présence du groupement hydroxyle est fondamentale pour l'activité œstrogénique. La présence d'un second groupement fonctionnel à base d'oxygène (hydroxyle, cétone, ou carbonyle), positionné sur la partie terminale de la molécule, en opposition au cycle phénolique, confère ou du moins augmente l'activité œstrogénique. C'est le cas du BPA et du bisphénol F (BPF, 4,4'-Méthylbisphénol) du bisphénol A diméthacrylate (BIS-DMA) et du bisphénol-A-bis chloroformate (BPACF). Ces substances montrent une activité œstrogénique lors des tests de prolifération et d'induction protéique.

Par ailleurs, la nature des substituants liés au pont carbone peut déterminer l'activité œstrogénique. Par exemple, la substitution des groupements méthyles positionnés sur ce dernier, par des groupements hydrophiles provoque une baisse de l'activité œstrogénique, causée par la diminution de la force d'interaction avec la partie hydrophobe du récepteur. Le remplacement des groupements CH₃ par des groupements CF₃, (bisphénol AF) ou encore la substitution du cycle benzénique B par des groupements méthyles ou éthyles dérivés (4-tert-butylphénol et 4-tert-amylphénol) se traduit par une baisse significative de l'activité. En revanche, le remplacement des deux groupements méthyles par des chaînes propylées accroît l'expression des gènes et des protéines.

La présence de substituants chlorés en position 3 ou 5 sur le cycle A a également un effet significatif sur l'activité. Les dérivés chlorés qui peuvent se former lors du recyclage du papier thermique (par blanchissage à l'hypochlorite de sodium) sont 28 fois plus œstrogéniques que le BPA.

BIBLIOGRAPHIE

AGATONOVIC-KUSTRIN S, TURNER JV. Molecular structural characteristics of estrogen receptor modulators as determinants of estrogen receptor selectivity. *Mini-Rev Med Chem* 2008, **8** : 943-951

ANSTEAD GM, CARLSON KE, KATZENELLENBOGEN JA. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997, **62** : 268-303

BRZOWSKI A, PIKE A, DAUTER Z, HUBBARD R, BONN T et coll. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997, **389** : 753-758

COLEMAN KP, TOSCANO WA, WIESE TE. QSAR Models of the *in vitro* Estrogen Activity of Bisphenol A Analogs. *QSAR Comb Sci* 2003, **22** : 78-88

DEVILLERS J, MARCHAND-GENESTE N, CARPY A, PORCHER JM. SAR and QSAR modeling of endocrine disruptors. *SAR QSAR Env Res* 2006, **17** : 393-412

DODDS EC, LAWSON W Synthetic estrogens without the phenanthrene nucleus. *Nature* 1936, **137** : 996

FANG H, TONG W, SHI LM, BLAIR R, PERKINS R et coll. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 2001, **14** : 280-294

FUKUZAWA K, KITaura K, UEBAYASI M, NAKATA K, KAMINUMA T, NAKANO T. Ab initio quantum mechanical study of the binding energies of human estrogen receptor alpha with its ligands: an application of fragment molecular orbital method. *Comput Chem* 2005, **26** : 1-10

FUKAZAWA H, WATANABE M, SHIRAISHI H, SHIOZAWA T, MATSUSHITA H, et coll. Formation of Chlorinated Derivatives of Bisphenol A in Waste Paper Recycling Plants and Their Estrogenic Activities. *J Health Sci* 2002, **48** : 242-249

GAO H, KATZENELLENBOGEN JA, GARG R, HANSCH C. Comparative QSAR analysis of estrogen receptor ligands. *Chem. Rev.* **1999**; 99: 723.

JENSEN GE, NIEMELÄ JR, WEDEBYE EB, NIKOLOV NG. QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use--a preliminary investigation. *SAR QSAR Env Res* 2008, **9** : 631-641

KADOWAKI T, WHEELLOCK CE, ADACHI T, KUDO T, OKAMOTO S et coll. Identification of endocrine disruptor biodegradation by integration of structure-activity relationship with pathway analysis. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 7997-8003

KITAMURA S, SUZUKI T, SANOH S, KOHTA R, JINNO N, SUGIHARA K, YOSHIHARA S, FUJIMOTO N, WATANABE H, OHTA S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Tox Sc* 2005, **84** : 249-259

LIU H, PAPA E, WALKER J, GRAMATICA P. In silico screening of estrogen-like chemicals based on different nonlinear classification models. *Mol Grap Mod* 2007, **26** : 135-144

LIU H, PAPA E, GRAMATICA P. QSAR prediction of estrogen activity for a large set of diverse chemicals under the guidance of OECD principles. *Chem Res Toxicol* 2006, **19** : 1540-1548

OKADA H, TOKUNAGA T, LIU X, TAKAYANAGI S, MATSUSHIMA A, SHIMOHIGASHI Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Env Health Persp* 2008, **116** : 32-38

PEREZ P, PULGAR R, OLEA-SERRANO F, VILLALOBOS M, RIVAS A, METZLER M, PEDRAZA V, OLEA N. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Persp* 1998, **106** :167-174

RONCAGLIONI A, BENFENATI E. In silico-aided prediction of biological properties of chemicals: oestrogen receptor-mediated effects. *Chem Soc Rev* 2008, **37** : 441-450

RONCAGLIONI A, PICLIN N, PINTORE M, BENFENATI E. Binary classification models for endocrine disrupter effects mediated through the estrogen receptor. *SAR QSAR Env Res* 2008, **19** : 697-733

SHI L, FANG H, TONG W, WU J, PERKINS R, et coll. QSAR models using a large diverse set of estrogens *J Chem Inf Comput Sci* 2001 **41** : 186

SIPPL W. Receptor-based 3D QSAR analysis of estrogen receptor ligands--merging the accuracy of receptor-based alignments with the computational efficiency of ligand-based methods. *Comp Aid Mo. Des* 2000, **14** : 559-572

SOTO A, SONNENSCHN E, CHUNG K, FERNANDEZ MF, OLEA N, SERRANO FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 113-122

TANENBAUM DM., WANG Y., WILLIAMS SP., SIGLER PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998, **95** : 5998-6003

TONG W, FANG H, HONG H, XIE Q, PERKINS R et coll. Regulatory application of SAR/QSAR for priority setting of endocrine disruptors: A perspective *Pure Appl Chem* 2003, **75** : 2375-2388

WALLER CLJ. A comparative QSAR study using CoMFA, HQSAR, and FRED/SKEYS paradigms for estrogen receptor binding affinities of structurally diverse compounds. *Chem Inf Comput Sci* 2004, **44** : 758-765

9

Autres modèles d'études

La plupart des travaux menés jusqu'à aujourd'hui abordent les effets du bisphénol A (BPA) comme étant des effets essentiellement de type œstrogénique. Bien que de tels effets aient été démontrés *in vitro*, leur démonstration *in vivo* reste peu probante et l'utilisation de modèles génétiquement modifiés propose également d'autres modes d'action possible.

Modèles génétiquement modifiés, études *in vitro*

Chez les mammifères

L'utilisation de modèles génétiquement modifiés pour détecter une activité œstrogénique en réponse au BPA est encore peu développée au niveau des tissus suspectés d'être de potentielles cibles de ce perturbateur (ovaire, utérus, prostate...). Quelques études ont utilisé des souris ER-luciférase et les résultats apparaissent variables (tableau I) et peu probants. Pourtant, de nombreux effets du BPA ont été rapportés chez l'adulte et chez le fœtus notamment à des doses faibles (allant jusqu'à 0,250 µg/kg/j). Cette discordance dans les observations pourrait provenir de la multiplicité des doses et des voies d'administration utilisées. Notons également que peu de travaux (voire aucun) ont utilisé des mutants pour les récepteurs nucléaires *in vivo*, ou *in organo* pour tester les effets du BPA. Que les effets développementaux du BPA soient dus à une activité œstrogénique reste donc à établir.

Une approche intéressante et alternative est la transfection de constructions ERE-luciférase dans des cellules *in vitro*. Une illustration de cette approche est la transfection de cellules de Leydig fœtales par une construction ERE-luc qui a permis de démontrer l'activité œstrogénique du BPA *in vitro* dans ces cellules.

Enfin, sur une lignée de souris mutante pour l'aromatase, l'enzyme permettant la production d'œstrogène, souris ArKO, un traitement au BPA permet de restaurer les fonctions ovariennes et utérines (Toda et coll., 2002). Ce travail démontre bien une activité de type œstrogénique du BPA.

Tableau I : Effet du BPA dans divers modèles *in vivo*

Références	Dose (µg/kg)	Voie d'administration	Modèle	Observations
Lemmen et coll., 2004a et 2004b	1 000	Ip	Souris hétérozygote ER-luc	Induction de l'activité luciférase après 8 h, cependant plus d'effet visible après 24 h d'exposition à 10 000 µg/kg
Laws et coll., 2000	200 000	Sc et vo	Rats Long-Evans ovariectomisés	Augmentation du poids de l'utérus chez les rats pré-pubères (test utéro-trophique)

Tinwell et coll., 2002	50 000	Vo	Rats Alderley Park	Augmentation de l'âge de l'ouverture vaginale après exposition pendant la gestation
Tyl et coll., 2002	500 000	Exposition alimentaire	Rats Sprague-Dawley	Pas d'effet sur le poids utérin, mais altération du nombre d'implantations et de la taille des portées (exposition sur trois générations)
Honma et coll., 2002	20	Sc et vo	Souris ICR (CD-1)	Les descendants présentent une ouverture vaginale précoce après exposition pendant la gestation
Tinwell, et coll., 2000	300 000	Sc et vo	Souris AP	Pas d'effet œstrogénique dans le test utérotrophique chez des souris immatures après trois jours d'exposition
Takagi et coll., 2004	env 150 000	3 000 ppm dans la nourriture	Rats Sprague-Dawley	Pas d'effet sur l'ouverture vaginale ou la cyclicité œstrienne après une exposition périnatale (exposition alimentaire des mères)
Markey et coll., 2001	25-250	Pompe osmotique maternelle	Souris CD-1	Augmentation du nombre de structures terminales épithéliales dans la glande mammaire après une exposition pendant la gestation
Ter Veld et coll., 2009	50 000	Vo	Souris gestante ER-luc	Pas d'augmentation significative de l'activité luciférase dans les tissus maternels et fœtaux, faible diminution de l'activité dans le placenta

Abréviations : ip : intra-péritonéal ; vo : voie orale

Chez les poissons téléostéens et les amphibiens

Des lignées transgéniques de poissons ont également été utilisées. Dans une première approche une construction de type ERE-tk-Luc a été introduite chez le zebrafish et l'exposition aux œstrogènes pendant la phase larvaire a montré une activation significative (200 fois à 1 microM sur des larves âgées de 35 jours). Un seuil de détection à 1 nM d'œstradiol a été observé (Legler et coll., 2000). Sur une lignée indépendante de zebrafish où un ERE a été placé en amont du promoteur de la vitellogénine et du gène de la GFP (ERE-zvtg1-GFP) une induction de l'expression de la GFP à une concentration de 0,01 µg/l d'éthynylœstradiol a été observée. L'ajout de BPA à une concentration de 1 000 µg/l a également été noté après 13 jours d'exposition, ce qui montre que le BPA est faiblement œstrogénique *in vivo* chez le poisson-zèbre (Chen et coll., 2010). La même dose de 1 000 µg/l induit l'expression de la GFP après 21 jours d'exposition dans une lignées mvtg1-GFP ou le promoteur du gène de la vitellogénine 1 de médaka a été fusionné à la GFP (Zeng et coll., 2005).

L'ensemble de ces données encore fragmentaires confirme la faible œstrogénicité du BPA *in vivo* puisque ce composé est 10 000 fois moins puissant que le ligand naturel *in vivo* (Chen et coll., 2010 ; Zeng et coll., 2010). Cela pose la question de savoir si les effets phénotypiques observés après l'exposition sont bien liés à une perturbation œstrogénique. Finalement, il faut noter qu'aucun des modèles transgéniques actuellement disponibles chez le poisson ne permet de détection d'une activation œstrogénique à des stades embryonnaires précoces.

Des systèmes similaires ont été également développés chez le Xénope. Ainsi, une lignée transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène TH-bZIP a été utilisée pour suivre les effets du bisphénol A sur la fonction thyroïdienne (Fini et coll., 2007). TH-bZIP est en effet un gène régulé par ces hormones et il a été montré que le bisphénol avait,

comme cela a été montré chez les Mammifères, un effet inhibiteur sur la fonction thyroïdienne (Fini et coll., 2007).

Études chez les poissons téléostéens

La quasi totalité des études menées chez les poissons téléostéens l'ont été en considérant que le BPA était un xœstrogène et ont donc mesuré des paramètres phénotypiques liés à cette activité œstrogénique. Les principales espèces étudiées dans ces dispositifs sont le medaka (*Oryzias latipes*) et le zebrafish (*Danio rerio*) mais d'autres espèces comme la truite (*Oncorhynchus mykiss*), le killifish (*Fundulus heteroclitus*), parmi de nombreuses autres, ou même une espèce hermaphrodite comme *Rivulus marmoratus* ont été utilisées. Il n'est donc pas possible de dresser ici une liste exhaustive des travaux qui ont été menés. Ces modèles ont bien sûr l'avantage de tester la présence de molécules œstrogéniques directement dans les eaux en exposant directement les adultes ou les embryons. Il est ainsi possible assez directement de faire le lien entre un effet observé à une certaine concentration et les quantités de perturbateurs endocriniens présents dans une rivière donnée (Kashiwada et coll., 2002).

Activation des récepteurs nucléaires des œstrogènes

La capacité du BPA à activer des récepteurs des œstrogènes de différentes espèces a été étudiée. On observe des différences faibles au niveau des EC50⁷ observées. Ainsi, Matthews et coll. (2002), dans un test sur cellules mammaires humaines (MCF7), mené avec le domaine de fixation du ligand de ER α de différentes espèces lié au domaine de fixation à l'ADN de Gal4, obtiennent des valeurs de EC50 allant de 0,3 à 3 μ M avec les activités les plus fortes pour les récepteurs de souris et de truite arc-en-ciel et des activités plus faibles pour les récepteurs de poulet ou de Xénope. Des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles cellulaires de poisson (cellules gonadiques RTG-2 ; lignée d'hépatome PLHC1 ; Ackermann et coll., 2002 ; Rutishauser et coll., 2004 ; Olsen et coll., 2005 ; Cosnefroy et coll., 2009). À notre connaissance, aucun test de ce type n'a encore été réalisé sur les ER β clonés chez les poissons ou le Xénope.

Différents tests

Dans un premier type de test, les effets du bisphénol A sont étudiés en terme de toxicité générale sur des paramètres très intégrés : la survie (Nagel, 2002 ; Kashiwada et coll., 2002 ; Ishibashi et coll., 2005), la capacité de ponte (Shioda et Wakabayashi, 2000), la capacité des œufs à éclore (Shioda et Wakabayashi, 2000 ; Kashiwada et coll., 2002 ; Segner et coll. 2003), le développement normal des embryons (Pastva et coll., 2001 ; Duan et coll., 2008), la présence d'ovotestis c'est-à-dire l'apparition chez un poisson mâle d'une gonade comprenant à la fois les aspects des testicules et des ovaires (Kang et coll., 2002). L'ensemble de ces paramètres phénotypiques est utilisé dans un test bien cadré, le test DarT (Nagel, 2002). En se basant sur ce type d'expériences et bien que des différences parfois significatives puissent être observées d'un paramètre à l'autre et en fonction des dispositifs d'exposition utilisés, des effets à des doses à partir de 100 μ g/l ont été obtenus.

D'autres tests mesurent des effets plus directement œstrogéniques et la plupart d'entre eux se focalisent sur la mesure de l'induction des vitellogénines chez les mâles. Ces protéines sont normalement produites par le foie chez les femelles, passent dans la circulation générale et vont s'accumuler dans l'œuf. L'exposition des mâles (zebrafish ou medaka) aux

⁷ Concentration molaire d'un agoniste, qui produit 50 % de la réponse maximale pour cet agoniste

œstrogènes induit la synthèse de vitellogénine et cela offre donc un test simple pour mesurer les effets du BPA (Segner et coll., 2003 ; Van der Belt et coll., 2003 ; Yamaguchi et coll., 2005 ; Muncke et coll., 2007). Ceci a même débouché sur un test utilisé en routine, le test MolDarT qui permet de détecter des effets du BPA à des concentrations de 10 µM. De nombreuses autres espèces de poissons ont été utilisées dans ce type de test (Segner et coll., 2003 ; Van der Belt et coll., 2003 ; Pait et coll., 2003 ; Seo et coll., 2006). Lee et coll. (2002) ont observé des effets similaires en étudiant chez le medaka un autre gène sensible aux œstrogènes, la choriogénine : une induction après 6 jours de traitements à 50 µg/l de BPA a été obtenue. Finalement, il faut noter que des gènes différents, non liés à la vitellogénine, ont également été utilisés comme marqueurs : c'est le cas de ER α , AR, les aromatasés, CYP19 (Min et coll., 2003 ; Tabata et coll., 2003 et 2004 ; Yamaguchi et coll., 2005 ; Lee et coll., 2006 ; Diotel et coll., 2010) avec des effets le plus souvent positifs mais parfois également des effets inhibiteurs sur leur niveau d'expression. En général, ces tests sont plus sensibles que les tests purement morphologiques et montrent un effet à des concentrations de 100 µg/l, la voie majoritaire d'exposition étant d'ajouter simplement, le plus souvent pendant quelques jours, le BPA dans l'eau des aquariums dans lequel vivent des mâles adultes.

Autres approches

Enfin, des travaux plus mécanistiques permettent d'affiner en termes moléculaires les effets du BPA. Des approches transcriptomiques ont permis de mettre en évidence le réseau de gènes modifiés après une exposition au BPA et de comparer celui-ci aux gènes dont l'expression est altérée par les œstrogènes. Ceci a été fait chez le zebrafish (Kausch et coll., 2008) et chez la carpe (Moens et coll., 2006 et 2007) et dans les deux cas les gènes exprimés dans le foie ont été étudiés. Les résultats dans les deux espèces montrent que le BPA régule une série de gènes spécifiques différents de ceux régulés par les œstrogènes. Mais si dans les expériences menées chez la carpe le profil transcriptionnel du BPA est globalement proche de celui observé avec des produits clairement œstrogéniques comme l'éthinylœstradiol, ce n'est pas le cas chez le zebrafish. Chez cette espèce, 211 gènes sont régulés par les œstrogènes alors que seulement 47 le sont par le bisphénol. Les seuls gènes en commun régulés par les deux produits sont les vitellogénines. Ces résultats posent la question de la validité des approches visant à conclure à l'œstrogénicité d'un produit en utilisant simplement l'induction de ces gènes comme critère. La comparaison détaillée des profils transcriptionnels générés par le BPA et les œstrogènes apportera certainement des éléments clefs pour mieux caractériser les effets de ce produit en termes de mécanismes d'action.

Un modèle amphibien, le xénope (*Xenopus laevis*), a également été utilisé pour caractériser les effets du BPA. Des traitements de têtards à des doses de 10 ou 100 nM de BPA induit une féminisation de ces derniers bien que cet effet ne soit pas retrouvé dans tous les types de traitements effectués, notamment lorsqu'on modifie la période d'exposition (Levy et coll., 2004 ; Pickford et coll., 2003). Comme chez les poissons, le BPA peut induire l'expression ou la synthèse de vitellogénine chez le xénope mais il n'est que faiblement actif par rapport à l'œstradiol puisqu'il ne montre que 0,008 % de l'activité du 17 β -œstradiol (Mitsui et coll., 2007).

Des effets différents, agissant sur d'autres voies de signalisation que celle des ER ont également été observés chez le Xénope. Une exposition à des doses de 20 µM de BPA à des stades précoces de développement (avant le stade 10) induit des malformations de la région céphalique, associées à l'induction d'une apoptose dans le cerveau et la moelle épinière des animaux traités (Oka et coll., 2003 ; Sone et coll., 2004). Cet effet développemental a été associé à des anomalies de la voie Notch et le BPA est en fait capable d'inhiber l'activité de la gamma-sécrétase (Imaoka et coll., 2007 ; Baba et coll., 2009). Plus récemment, une activité du

BPA sur la voie des hormones thyroïdiennes et donc sur le contrôle de la métamorphose a été mise en évidence (Heimeier et Shi, 2010). Le BPA à des doses fortes (20 µM) entraîne une décélération de la métamorphose induite par les hormones thyroïdiennes et diminue l'expression du récepteur TRβ (Iwamuro et coll., 2003). Cet effet a été reproduit à des doses plus faibles (0,1 µM) sur des cultures de queues de têtard et ces auteurs ont également montré un effet sur l'expression RXRγ, le partenaire d'hétérodimérisation de TRβ (Iwamuro et coll., 2006). En focalisant leur étude sur le remodelage intestinal induit par les hormones thyroïdiennes au cours de la métamorphose, Heimeier et coll. (2009) ont montré un effet clairement antagoniste du BPA, capable d'inhiber l'action régulatrice des hormones thyroïdiennes sur de nombreux gènes cibles. Ces données montrent donc que le spectre d'action du BPA est bien plus large que la seule action œstrogénique communément admise.

En conclusion, chez les mammifères, l'utilisation de modèles génétiquement modifiés pour détecter une activité œstrogénique en réponse au BPA est encore peu développée au niveau des tissus suspectés d'être de potentielles cibles de ce perturbateur (ovaire, utérus, prostate...).

Parallèlement, des lignées transgéniques de poissons confirme la faible œstrogénicité du BPA *in vivo*. Aucun des modèles transgéniques actuellement disponibles chez le poisson ne permet la détection d'une activation œstrogénique à des stades embryonnaires précoces.

La quasi-totalité des études menées chez les poissons téléostéens (medaka, zebrafish) ou d'autres espèces comme la truite, le killifish... ont mesuré des paramètres phénotypiques liés à une activité œstrogénique. Ces modèles ont l'avantage de tester la présence de molécules œstrogéniques directement dans les eaux en exposant directement les adultes ou les embryons.

Par des approches transcriptomiques, réalisées chez le zebrafish et la carpe, les gènes exprimés dans le foie ont été étudiés. Les résultats montrent que le BPA régule une série de gènes spécifiques différents de ceux régulés par les œstrogènes. Ces résultats posent la question de la validité des approches visant à conclure à l'œstrogénicité d'un produit en utilisant simplement l'induction de ces gènes comme critère. La comparaison détaillée des profils transcriptionnels générés par le BPA et les œstrogènes apportera certainement des éléments clés pour mieux caractériser les effets de ce produit en termes de mécanismes d'action.

De nouveaux modèles d'études, notamment les cellules humaines, pour caractériser chez l'homme les effets et les mécanismes d'actions du BPA et de ses éventuels produits de substitution s'avèrent indispensable. Les futures évaluations de risque produites par les agences sanitaires devront intégrer ces nouvelles approches.

BIBLIOGRAPHIE

ACKERMANN GE, BROMBACHER E, FENT K. Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents. *Environ Toxicol Chem* 2002, **21** : 1864-1875

BABA K, OKADA K, KINOSHITA T, IMAOKA S. Bisphenol A disrupts Notch signaling by inhibiting gamma-secretase activity and causes eye dysplasia of *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci* 2009, **108** : 344-355

CHEN H, HU J, YANG J, WANG Y, XU H, et coll. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. *Aquat Toxicol* 2010, **96** : 53-61

- COSNEFROY A, BRION F, GUILLET B, LAVILLE N, PORCHER JM, et coll. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicol In Vitro* 2009, **23** : 1450-1454
- DIOTEL N, PAGE YL, MOURIEC K, TONG SK, PELLEGRINI E, et coll. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 2010, **31** : 172-192
- DUAN Z, ZHU L, ZHU L, KUN Y, ZHU X. Individual and joint toxic effects of pentachlorophenol and bisphenol A on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008, Mar 20. [Epub ahead of print]
- FINI JB, LE MEVEL S, TURQUE N, PALMIER K, ZALCO D, et coll. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 5908-5914
- HEIMEIER RA, DAS B, BUCHHOLZ DR, SHI YB. The xenestrogen bisphenol A inhibits postembryonic vertebrate development by antagonizing gene regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 2009, **150** : 2964-2973
- HEIMEIER RA, SHI YB. Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *Gen Comp Endocrinol* 2010, sous presse
- HONMA S, SUZUKI A, BUCHANAN DL, KATSU Y, WATANABE H, IGUCHI T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* 2002, **16** : 117-122
- IMAOKA S, MORI T, KINOSHITA T. Bisphenol A causes malformation of the head region in embryos of *Xenopus laevis* and decreases the expression of the ESR-1 gene mediated by Notch signaling. *Biol Pharm Bull* 2007, **30** : 371-374
- ISHIBASHI H, WATANABE N, MATSUMURA N, HIRANO M, NAGAO Y, et coll. Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sci* 2005, **77** : 2643-2655
- IWAMURO S, SAKAKIBARA M, TERAOKA M, OZAWA A, KUROBE C, et coll. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 2003, **133** : 189-198
- IWAMURO S, YAMADA M, KATO M, KIKUYAMA S. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Sci* 2006, **79** : 2165-2171
- KANG IJ, YOKOTA H, OSHIMA Y, TSURUDA Y, OE T, et coll. Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 2002, **21** : 2394-2400
- KASHIWADA S, ISHIKAWA H, MIYAMOTO N, OHNISHI Y, MAGARA Y. Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Res* 2002, **36** : 2161-2166
- LAWS SC, CAREY SA, FERRELL JM, BODMAN GJ, COOPER RL. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 2000, **54** : 154-167
- LEE C, NA JG, LEE KC, PARK K. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. *Aquat Toxicol* 2002, **61** : 233-241
- LEE YM, SEO JS, KIM IC, YOON YD, LEE JS. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345** : 894-903
- LEGLER J, BROEKHOF JLM, BROUWER A, LANSER PH, MURK AJ, et coll. A novel in vivo bioassay for (xeno-)estrogens using transgenic zebrafish. *Environmental Science and Technology* 2000, **34** : 4439-4444
- LEMMEN JG, ARENDS RJ, VAN BOXTEL AL, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. Tissue- and time-dependent estrogen receptor activation in estrogen reporter mice. *J Mol Endocrinol* 2004a, **32** : 689-701

- LEMMEN JG, ARENDS RJ, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2004b, **112** : 1544-1549
- LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, KLOAS W. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res* 2004, **94** : 102-111
- LIETKE A, MUNCKE J, RÜFENACHT K, EGGEN RI. Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT. *Environ Toxicol* 2008, **23** : 59-67
- MARKEY CM, LUQUE EH, MUNOZ DE TORO M, SONNENSCHNEIN C, SOTO AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1215-1223
- MATTHEWS JB, FERTUCK KC, CELIUS T, HUANG YW, FONG CJ, ZACHAREWSKI TR. Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen receptors from various species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002, **82** : 181-194
- MIN J, LEE SK, GU MB. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in *oryzias latipes* liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2003, **17** : 272-277
- MITSUI N, TOOI O, KAWAHARA A. Vitellogenin-inducing activities of natural, synthetic, and environmental estrogens in primary cultured *Xenopus laevis* hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007, **146** : 581-587
- MOENS LN, VAN DER VEN K, VAN REMORTEL P, DEL-FAVERO J, DE COEN WM. Expression profiling of endocrine-disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicol Sci* 2006, **93** : 298-310
- MOENS LN, VAN DER VEN K, VAN REMORTEL P, DEL-FAVERO J, DE COEN WM. Gene expression analysis of estrogenic compounds in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) using a custom cDNA microarray. *J Biochem Mol Toxicol* 2007, **21** : 299-311
- MUNCKE J, JUNGHANS M, EGGEN RI. Testing estrogenicity of known and novel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 2007, **22** : 185-193
- NAGEL R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002, **19** : 38-48
- OKA T, ADATI N, SHINKAI T, SAKUMA K, NISHIMURA T, KUROSE K. Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **312** : 877-882
- OLSEN CM, MEUSSEN-ELHOLM ET, HONGSLO JK, STENERSEN J, TOLLEFSEN KE. Estrogenic effects of environmental chemicals: an interspecies comparison. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005, **141** : 267-274
- PAIT AS, NELSON JO. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquat Toxicol* 2003, **64** : 331-342
- PASTVA SD, VILLALOBOS SA, KANNAN K, GIESY JP. Morphological effects of Bisphenol-A on the early life stages of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 2001, **45** : 535-541
- PICKFORD DB, HETHERIDGE MJ, CAUNTER JE, HALL AT, HUTCHINSON TH. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 2003, **53** : 223-235
- RUTISHAUSER BV, PESONEN M, ESCHER BI, ACKERMANN GE, AERNI HR, et coll. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ Toxicol Chem* 2004, **23** : 857-864
- SEGNER H, NAVAS JM, SCHÄFERS C, WENZEL A. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003, **54** : 315-322
- SEO JS, LEE YM, JUNG SO, KIM IC, YOON YD, LEE JS. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase

- genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **346** : 213-223
- SHIODA T, WAKABAYASHI M. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 2000, **40** : 239-243
- SONE K, HINAGO M, KITAYAMA A, MOROKUMA J, UENO N, et coll. Effects of 17beta-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *Gen Comp Endocrinol* 2004, **138** : 228-236
- TABATA A, MIYAMOTO N, OHNISHI Y, ITOH M, YAMADA T, et coll. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 2003, **47** : 51-57
- TABATA A, WATANABE N, YAMAMOTO I, OHNISHI Y, ITOH M, et coll. The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 2004, **50** : 125-132
- TAKAGI H, SHIBUTANI M, MASUTOMI N, UNEYAMA C, TAKAHASHI N, et coll. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch Toxicol* 2004, **78** : 97-105
- TER VELD MG, ZAWADZKA E, RIETJENS IM, MURK AJ. Estrogenicity of food-associated estrogenic compounds in the fetuses of female transgenic mice upon oral and IP maternal exposure. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 133-139
- TINWELL H, JOINER R, PATE I, SOAMES A, FOSTER J, ASHBY J. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000, **32** : 118-126
- TINWELL H, HASEMAN J, LEFEVRE PA, WALLIS N, ASHBY J. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 339-348
- TODA K, MIYAURA C, OKADA T, SHIZUTA Y. Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (*Cyp19*). *Eur J Biochem* 2002, **269** : 2214-2222
- TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146
- VAN DER BELT K, VERHEYEN R, WITTERS H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003, **56** : 271-281
- YAMAGUCHI A, ISHIBASHI H, KOHRA S, ARIZONO K, TOMINAGA N. Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 2005, **72** : 239-249
- ZENG Z, SHAN T, TONG Y, LAM SH, GONG Z. Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environ Sci Technol* 2005, **39** : 9001-9008