

25

Études 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, et 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 $\mu\text{g/kg/j}$. En effet, ces études sont les plus proches des niveaux d'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 $\mu\text{g/kg/j}$ à 600 000 $\mu\text{g/kg/j}$ chez la souris, et de 1 μg à 500 000 μg chez le rat ; un groupe témoin positif reçoit par voie orale du 17 β 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) et sont basées sur la ligne directrice 416 de l'OCDE pour les études de reprotoxicité des 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 visuelle). Enfin, dans les deux études, les animaux sont alimentés avec un régime non dépourvu de phyto-œstrogènes.

L'étude récente de Kobayashi et coll. (2010) examine les effets d'une exposition au bisphénol A à faible dose sur la reproduction de deux générations de souris C57BL/6J. Les femelles gestantes F0 ont reçu une alimentation contenant de faibles doses de bisphénol A (0, 0,33, 3,3 ou 33 mg/kg de nourriture) du 6^e jour de gestation au 22^e jour postnatal, et les souriceaux sevrés de chaque groupe issus de F0 et F1, respectivement, ont également été nourris avec ces mêmes concentrations de bisphénol A *ad libitum* jusqu'au sacrifice. Les auteurs notent une légère augmentation de l'épididyme chez les mâles F1. Cependant, seuls les poids bruts des organes sont indiqués. Des paramètres comme le rendement de la fertilité en F1 et les pertes implantatoires sont absents. L'étude sur les spermatozoïdes (mobilité) ne semble pas avoir exploité toutes les possibilités offertes par la méthode utilisée. Globalement, cette étude au *design* intéressant révèle un certain nombre de limites méthodologiques.

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 lignées 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 lignée de rat Holtzman. 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 phyto-œstrogènes. Le Diéthylstilbestrol (DES) sert de témoin positif (10 µg/kg/j). Les rats jeunes adultes 75 jours après la naissance sont croisés avec des femelles témoins. Les mâles non exposés en F2 et F3 sont étudiés. À 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 ERβ 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'éthinyl-œstradiol (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 anogénitale 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 phytoœstrogènes.

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 non l'œstradiol, peut suggérer une éventuelle modification de l'activité aromatase.

Chez la souris, Okada et coll. (2008) ont évalué l'effet du BPA (comparé au 17β-œstradiol) 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 spermatides 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-oestradiol (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 des 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 témoin positif (1 600 µg/kg/j). Le régime est dépourvu de phyto-œstrogènes. 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 témoins. 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 : éthinylœstradiol – 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 épидидymaires 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 impliquée dans la pathogénie des cancers de la prostate chez l'homme (Djavan et coll., 2001).

Chitra et coll. (2003) ont évalué l'effet du bisphénol A sur le système antioxydant des spermatozoïdes épидидymaires 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 épидидymes, 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 H_2O_2 et la peroxydation des lipides étaient augmentées. Ces résultats suggèrent qu'une exposition sub-chronique adulte au BPA provoque un épuisement des défenses antioxydantes, 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 copulation...) (tableau 25.I). 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.

Tableau 25.I : Paramètres phénotypiques affectés chez l'animal mâle

Paramètres phénotypiques	Espèces/lignée	Voies/Doses (µg/kg/j)	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids testicules, poids épidi- dymes, poids prostate, poids vésicules séminales	Souris	Orale : 0,2 à 5 000	Vom Saal, 1998
	Rat SD	SC : 100 à 3 000	Gupta, 2000
	Souris CD-1	Gestation/lactation/ adulte/multigénération	Ema et coll., 2001
	Rat Wistar		Chitra et coll., 2003
	Rat Holtzman		Kawai et coll., 2003
	Souris CF-1		Herath et coll., 2004
	Souris ICR		Kabuto et coll., 2004
			Salian et coll., 2009
			Kobayashi et coll., 2010

Paramètres phénotypiques	Espèces/lignée	Voies/Doses (µg/kg/j)	Références
Modification des paramètres spermatiques	Souris	Voie orale : 0,2 à 5 000	Vom Saal, 1998
	Rat Holtzman	Implants : 1 et 60	Ema et coll., 2001
Concentration	Souris ICR	SC : 100 à 3 000	Chitra et coll., 2003
Rendement	Rat Wistar	Gestation/lactation/ puberté/adulte	Herath et coll., 2004
Mobilité %	Rat SD		Okada et Kai, 2008
	Souris CF-1		Salian et coll., 2009
			Kobayashi et coll., 2010
Altérations des taux hormonaux	Souris CD-1,	Orale : 2-4 000	Kawai et coll., 2003
	Rat SD	SC : 100 à 3 000	Watanabe et coll., 2003
Testostérone	Rat Wistar	Implants : 1 et 60	Herath et coll., 2004
LH, FSH	Rat Holtzman	Gestation/lactation/ /puberté/adulte	Della Seta et coll., 2006
			Okada et Kai, 2008
			Salian et coll., 2009

SC : sous-cutanée

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, DESSI-FULGHERI F, FARABOLLINI F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 2006, **50** : 301-307

DJAVAN B, WALDERT M, SEITZ C, MARBERGER M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol* 2001, **19** : 225-233

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

GUPTA C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000, **224** : 61-68

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

KAWAI K, NOZAKI T, NISHIKATA H, AOU S, TAKII M, KUBOC. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice : the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 175-178

KOBAYASHI K, OHTANI K, KUBOTA H, MIYAGAWA M. Dietary exposure to low doses of bisphenol A : effects on reproduction and development in two generations of C57BL/6J mice. *Congenit Anom* 2010, **50** : 159-170

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

VOM SAAL FS, COOKE PS, BUCHANAN DL, PALANZA P, THAYER KA, et coll. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998, **14** : 239-260

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