

27

Effets cellulaires et tissulaires

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 des lésions d'endométriase (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. 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 (avec des doses entre 3 µg/kg/j et 600 mg/kg/j) 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 preuve qu'une augmentation du poids soit 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ 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 foetale 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) pendant la vie foetale 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 de culture d'organe. Le BPA semble donc agir directement sur la prostate et lorsque l'exposition a lieu au cours de la vie foetale, 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 (PDE4D), 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 ER α ; 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 lignées de souris, de faibles doses de BPA (2,5 et 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) *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. À 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$). À 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. À 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 ; Vanderberg 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ ou 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 postnatales) lorsqu'elles reçoivent une administration 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) 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 différemment exprimées entre les animaux exposés et les témoins. 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 et 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'organogénèse 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 cancérigènes). Un des mécanismes par lesquels le BPA pourrait modifier la susceptibilité aux cancérigènes 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 faibles doses 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, évoquée 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 et

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'angiogénèse. 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'ethinyl 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 (1 nM) 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.

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'accompagnent d'hyperplasies endométriales. Dans ce travail, les souris BALBC ont été exposées au BPA à de fortes doses injectées en sous-cutanée (100 et 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) dès le premier jour de la gestation jusqu'au 7^e jour postnatal. 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.

290 Du BPA (libre) a été retrouvé dans le foie de toutes les femelles traitées

(mères) et de leur descendance sans qu'il n'y ait de corrélation avec la survenue d'une pathologie semblable à l'endométriase.

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 endométriase.

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 stéroïdogenèse 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 PPAR gamma. 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 PPAR gamma. Les effets de la sur-expression de PPAR gamma 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 PPAR gamma 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 PPAR gamma.

Effets sur les cellules du testicule

292 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 foetal, dont la morphologie est voisine. Le BPA pourrait exercer des effets via un mécanisme indépendant de ER nucléaires sur les cellules de séminome (JKT1). 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) tracent un lien intéressant entre l'exposition au BPA et le stress oxydatif. Dans cette lignée, le BPA (100 μ M) 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 un modèle de cultures de cellules somatiques issues de testicules fœtaux de souris à 12,5 jpc, l'équipe de M. de Felici (La Sala et coll., 2010) a démontré que 25 μ M de BPA sont capables d'induire l'expression de la luciférase sous le contrôle d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Ces auteurs ont également démontré que parmi cette population de cellules, les cellules de Leydig fœtales représentaient la majorité des cellules exprimant ER α .

Bien qu'encore imparfait, ce modèle est un des premiers ayant mesuré l'effet œstrogénique du BPA directement au sein des cellules de Leydig fœtales.

Dans une lignée de cellules 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 μ M) 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. Plus récemment, la même équipe (Li et coll., 2010) a détaillé les effets du BPA (200 μ M, 24 h) dans un modèle de barrière hémato-testiculaire à l'aide de cultures primaires de cellules de Sertoli de rat. Dans ce modèle, le BPA perturbe transitoirement la barrière hémato-testiculaire ; cet effet est réversible dès 24 h après l'arrêt du traitement. L'intégrité des jonctions serrées est fortement diminuée par le BPA, et la production ou la

localisation de protéines associées avec les principales composantes de la barrière hémato-testiculaire (jonctions serrées, jonctions gap, spécialisations ectoplasmiques) telles que l'occludine, JAM-A, la N-cadherine, l' α - et la β -catenine et la connexine 43, sont altérées. Les auteurs rapportent également une activation de la voie ERK (phosphorylation de ERK1/2) induite par le BPA dans ce modèle et qui pourrait donc être un des mécanismes impliqués dans l'action du BPA sans pour autant que cela n'ait été formellement prouvé.

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 plusieurs lignées cellulaires proposent des mécanismes d'actions très divers du BPA qui ne se cantonnent pas aux effets de type œstrogénique. 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 lignées 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 lignées 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 A. Gene Expression Analysis of Human Endometrial Endothelial Cells Exposed to Bisphenol *Reprod Toxicol* 2009, **28** : 18-25

BUTEAU-LOZANO H, VELASCO G, CRISTOFARI M, BALAGUER P, PERROT-APPLANAT M. Xenœstrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *J Endocrinol* 2008, **196** : 399-412

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

GRASSELLI 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, LEUNGYK, 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

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* 2010, **118** : 400-406

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

LA SALA G, FARINI D, DE FELICI M. Estrogenic in vitro assay on mouse embryonic Leydig cells. *Int J Dev Biol* 2010, **54** : 717-722

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

LI MW, MRUK DD, LEE WM, CHENG CY. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107** : 17998-18003

MARKEY CM, LUQUE EH, MUNOZ DE TM, SONNENSCHN 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

MURRAYTJ, MAFFINI MV, UCCI AA, SONNENSCHN 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** : 70-76

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, THOMAS BF, KEIMOWITZAR, 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

VANDENBERG LN, MAFFINI MV, SCHAEBERLE CM, UCCI AA, SONNENSCHNEIN C, et coll. Perinatal Exposure to the Xencestrogen 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