

La problématique des faibles doses en évaluation des risques sanitaires

Période : janvier 2012 à mars 2012

Claude EMOND* et Pascale KRZYWKOWSKI**

* Université de Montréal – Département de santé environnementale et santé au travail – Montréal, Canada

** UQAM – GRETESS – Montréal, Canada

Mots clés : Faibles doses, BPA, NOAEL, ERS

L'amélioration des technologies et l'identification de nouveaux marqueurs biologiques ont montré que des expositions à des contaminants chimiques à de très faibles doses peuvent induire des effets sur la santé. Cependant, la littérature scientifique reste assez vague sur la définition de « faible dose ». Le National Toxicology Program, unité du National Institute of Environmental Health Sciences américain, définit les faibles doses comme un niveau de dose apparaissant dans les niveaux d'exposition humaine ou encore à des doses en dessous du seuil utilisé dans les études toxicologiques traditionnelles pour lesquels des effets sont observés (1,2). Cette incertitude liée à la définition peut entraîner un biais important dans l'évaluation des risques. De plus, dans la région dite des faibles doses, on retrouve des relations doses/effets ou doses/réponses montrant des courbes non monotones, ce qui augmente la complexité de l'évaluation des risques sanitaires (1).

Cette note de veille prend pour exemple le bisphénol A (BPA⁽¹⁾), une substance hautement prioritaire pour les agences sanitaires et réglementaires. Le BPA, par ses propriétés de perturbateur endocrinien (PE⁽²⁾), rend complexe l'évaluation de risques sanitaires en raison des effets observés aux faibles doses et de la diversité des modes d'action (MoA⁽³⁾) identifiés à ce jour (3,4).

Les deux articles présentés dans cette veille traitent des effets du BPA à de faibles doses : la première étude montre les effets du BPA sur les voies de signalisation de l'insuline et du transport du glucose dans le testicule du rat, ainsi qu'une diminution de la stéroïdogénèse ; le deuxième article montre que l'exposition au BPA pendant la gestation durant des fenêtres de sensibilité augmente considérablement les risques sanitaires, ici, le développement de l'asthme.

Le bisphénol A altère les voies de signalisation de l'insuline, l'homéostasie du glucose et diminue la stéroïdogénèse dans les testicules de rat : une étude *in vivo* et *in silico*

D'Cruz SC, Jubendradass R, Jayakanthan M, Rani SJA, and Mathur PP. Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: An *in vivo* and *in silico* study. Food and Chem Tox 2012;50 (3-4):1124-1133.

Résumé

Dans la mesure où le BPA pourrait être un agent diabétogène, l'article de D'Cruz *et al.* a voulu mettre en évidence les effets du BPA à des doses faibles sur les voies de signalisation induites par l'insuline ou impliquées dans l'homéostasie glucidique ainsi que sur la stéroïdogénèse, dans le testicule du rat.

L'étude a été menée chez des rats jeunes adultes (90 jours) exposés par gavage à doses répétées de 0,005 - 0,5 - 50 ou 500 µg de BPA/Kg de poids corporel/j pendant 45 jours (afin de couvrir un cycle de spermatogénèse). Toutes les doses utilisées étaient inférieures à la NOAEL⁽⁴⁾ de 5 mg/Kg de poids corporel/j établie par l'EFSA⁽⁵⁾ (5). Un groupe de rats exposé à l'E₂⁽⁶⁾ a servi de contrôle positif.

Divers marqueurs d'effets ont été utilisés tels les activités d'enzymes de la stéroïdogénèse et anti-oxydantes, la peroxydation des lipides, les niveaux de marqueurs insuliniques et d'un transporteur de glucose, le niveau plasmatique de

testostérone et la distribution du GLUT⁽⁷⁾-2 dans les testicules.

Les résultats ont montré des anomalies dans les testicules à la plus faible dose de BPA utilisée, telles qu'une diminution des niveaux d'insuline, une diminution des ligands des récepteurs de l'insuline (IRS⁽⁸⁾-1 et 2) et une diminution des kinases du phosphatidylinositol-3, de la stéroïdogénèse, une diminution de la concentration plasmatique de testostérone, une diminution de l'activité des principales enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase et catalase), ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique. Une diminution de l'expression d'un transporteur du glucose est également observée pour des doses égales ou supérieures à 0,5 µg de BPA/Kg de poids corporel/j. Les analyses histologiques ont révélé une diminution du nombre de cellules germinales dans les testicules dans le groupe le plus exposé (500 µg/kg pc/j).

La plausibilité des effets observés est renforcée par la mise en évidence de sites de liaison probables du BPA sur certains transporteurs de glucose présents dans les testicules (GLUT-2 et GLUT-8), altérant ainsi le transport du glucose dans ces organes. Les auteurs soulignent que l'insuline, chez les jeunes, est notamment impliquée dans la descente et la différenciation des testicules. La réponse à l'insuline et l'homéostasie calcique sont modulées par les niveaux d'œstrogène. Ainsi, le BPA pourrait altérer l'activation en cascade de la voie de signalisation de l'insuline en mimant l'action de l'œstrogène. Par ailleurs, le glucose est indispensable à la spermatogénèse et

à la stéroïdogénèse au plan énergétique ainsi qu'à la production de testostérone. Les modes d'action du BPA sur la glycémie pourraient expliquer la diminution du niveau des transporteurs de glucose GLUT-2 et GLUT-8, et en conséquence, celle du glucose dans les testicules. Selon les auteurs, ce travail démontre pour la première fois que de faibles doses de BPA pendant un cycle de spermatogénèse sont suffisantes pour induire une altération des voies de signalisation de l'insuline, de l'homéostasie du glucose et, par conséquent, de la stéroïdogénèse.

Commentaire

Cette étude décrit les effets du BPA sur différents modes d'action modulant l'activité de l'insuline, l'homéostasie du glucose et la stéroïdogénèse.

Bien que certains MoA demeurent à éclaircir, les impacts observés sur les voies de signalisation de l'insuline et la démonstration de l'existence de sites de liaison du BPA sur des transporteurs du glucose à des doses faibles renforcent la plausibilité des observations rapportées. Les auteurs discutent de leurs résultats en proposant un mode d'action cohérent dans lequel les effets du BPA s'exercent à la fois sur la régulation du niveau de stress oxydant intracellulaire, le niveau plasmatique d'insuline et sur l'homéostasie du glucose. Ces effets se conjuguent pour inhiber la stéroïdogénèse en diminuant le glucose disponible pour la demande énergétique des processus de production des spermatozoïdes et des hormones sexuelles mâles ainsi que le niveau d'insuline nécessaire à la différenciation et à la maturation des testicules. Le BPA induirait ce dernier effet à travers son rôle mimétique de l'E₂. L'élévation des espèces réactives oxydantes induites par le BPA semble également contribuer à la perturbation de la signalisation de l'insuline. Il en résulterait une augmentation des niveaux plasmatiques d'insuline et de glucose, induisant une diminution de l'expression de certains transporteurs du glucose dans les testicules et, conséquemment, une diminution de la stéroïdogénèse. Une étude sur l'extrapolation des MoA décrits dans cette expérience à l'espèce humaine est souhaitable.

Les doses de BPA utilisées dans cette étude ont été déterminées en considérant la dose tolérable journalière (50 µg/Kg de poids corporel/j). Dans la mesure où ces expériences sont menées chez des rats mâles jeunes adultes, cette étude met en évidence des effets délétères dans une population peu souvent considérée comme vulnérable aux effets observés.

L'exposition fœtale au bisphénol A est un facteur de risque de développement de l'asthme chez l'enfant : étude d'un modèle animal

Nakajima Y, Goldblum RM and Midoro-Horiuti T. Fetal exposure to bisphenol A as a risk factor for the development of childhood asthma: an animal model study. *Environ Health* 2012;11:1-8.

Résumé

Selon les auteurs, la prévalence de l'asthme dans les pays industrialisés est en forte augmentation. Les changements dans l'exposition environnementale pourraient y être associés. Les

auteurs ont émis l'hypothèse que le BPA (composé œstrogénique actif) pourrait contribuer à l'augmentation de cette prévalence en altérant le développement du système immunitaire lors d'une exposition des fœtus *in utero* ou dans les premiers PND⁽⁹⁾. L'objectif de cet article était d'étudier l'impact du métabolisme du BPA sur le système immunitaire, en particulier sur la réponse inflammatoire, responsable des réponses allergiques (de type Th2⁽¹⁰⁾), dans un scénario d'exposition périnatale.

Des souris BALB/c gestantes ont été exposées de GD7⁽¹¹⁾ à GD21⁽¹¹⁾ à une dose de 10 µg de BPA/mL dans l'eau de boisson, reproduisant une exposition humaine environnementale. À la naissance, les fœtus exposés *in utero* ont été séparés en deux groupes; l'un encore exposé pendant l'allaitement tandis que l'autre était allaité par des femelles non exposées au BPA; un troisième groupe constitué de petits non exposés pendant la gestation et allaités par des mères exposées au BPA. Un quatrième groupe témoin était non exposé. Enfin, un sous-groupe de petits a été sensibilisé par une injection intra-péritonéale d'ovalbumine. La réponse allergique induite ensuite par l'administration d'ovalbumine en aérosol a été analysée par la mesure de l'hyperréactivité bronchique.

Les résultats révèlent une augmentation significative de l'hyperréactivité des voies respiratoires chez les individus sensibilisés à l'ovalbumine et exposés *in utero*, comparativement aux témoins et au groupe exposé seulement après la naissance. Les animaux non sensibilisés à l'ovalbumine et traités au BPA ne présentent pas d'hyperréactivité du système respiratoire. Cette réponse est accompagnée par une augmentation de l'inflammation pulmonaire (augmentation spécifique du nombre d'éosinophiles). Les résultats montrent que le niveau d'ARNm d'une enzyme hépatique métabolisant le BPA est faible (0,1 % des niveaux de l'adulte) jusqu'à la naissance et augmente rapidement durant la période post-natale pour atteindre le niveau adulte vers le cinquième jour, tandis qu'une autre enzyme de la même famille mais ne métabolisant pas le BPA est déjà exprimée pendant la gestation. Le niveau sérique du composé mesuré à la fin du traitement était de l'ordre de quelques dizaines de ng/mL, soit du même ordre de grandeur que les niveaux mesurés dans l'espèce humaine.

Les résultats suggèrent que le BPA contribue au développement d'une hyperréactivité du système respiratoire, mais uniquement chez des animaux ayant été au préalable sensibilisés. La période critique d'exposition au BPA se situe pendant la gestation.

Commentaire

Cet article démontre qu'une exposition fœtale au BPA affecte le développement du système immunitaire et que le BPA pourrait être un facteur de risque dans l'apparition de l'asthme chez l'enfant. Il montre également qu'une exposition au BPA *via* le lait maternel chez le nouveau-né non exposé pendant la vie fœtale n'induit pas de sensibilisation. La notion de fenêtre de vulnérabilité modulant l'apparition ultérieure de pathologies est donc mise en évidence. Toutefois, les auteurs n'ont évalué qu'un marqueur d'inflammation. Leur analyse aurait par exemple pu être approfondie par l'étude de marqueurs plus spécifiques de

la réponse Th2 (par exemple, niveau d'interleukine IL4⁽¹²⁾) ou des anticorps spécifiques contre l'ovalbumine.

Bien qu'une seule concentration de BPA ait été utilisée, induisant des concentrations plasmatiques chez la souris légèrement supérieures à celles retrouvées chez la femme enceinte dans deux études, cette étude est d'autant plus pertinente qu'il existe des similarités dans la réponse Th2 entre la souris et l'espèce humaine. De plus, dans la mesure où de nombreuses substances potentiellement allergènes sont aujourd'hui présentes dans l'environnement (pollens, additifs alimentaires...), il est plausible que l'exposition fœtale conduise au développement ultérieur de sensibilisation, comme cela a été observé dans l'article.

Une des limites de cette étude est la différence de métabolisation du BPA entre l'espèce humaine et les rongeurs. Dans l'espèce humaine, un grand nombre d'enzymes est capable de métaboliser le BPA. Ainsi, la demi-vie du BPA chez les fœtus humains pourrait être inférieure à celle des modèles murins puisqu'il peut être conjugué, donc inactivé, par un plus grand nombre d'enzymes. Cependant, la glycoconjugaison par les enzymes UGT⁽¹³⁾ de type 1 et 2 est limitée lors du développement dans l'espèce humaine (6). D'autres enzymes sont aussi susceptibles de conjuguer ou déconjuguer le BPA dans l'espèce humaine. L'équilibre dynamique du composé est donc dépendant de nombreux paramètres. D'autres études seront nécessaires pour établir cette relation et surtout pour estimer la plausibilité d'une extrapolation dans l'espèce humaine.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La démarche d'ERS⁽¹⁴⁾ se doit d'évoluer constamment en fonction de nouveaux concepts scientifiques éprouvés. Toutefois, la mise en œuvre de ces changements s'avère complexe quand ils viennent confronter des acquis reconnus. Les notions de faible dose et de relation dose/réponse aux courbes non monotones remettent en question certains principes. Les substances aux effets de PE2, tel le BPA, illustrent bien que ce n'est plus seulement la dose d'exposition qu'il importe de connaître, mais la dose interne dans le(s) organe(s) cible(s) et les fenêtres de sensibilité. De plus, la diversité des mécanismes d'action complexifie encore plus l'ERS.

Les deux articles sélectionnés pour cette note démontrent que le BPA peut effectivement induire *in vivo* des effets nocifs sur différents systèmes biologiques, à un âge spécifique et à des doses faibles. Ces doses d'exposition expérimentales sont compatibles avec les niveaux d'exposition environnementale. Le premier article apporte des arguments qui pourraient remettre en cause la valeur de référence de l'EFSA pour le BPA. Ainsi, l'augmentation de l'incidence des cas de diabète de type 2 ou encore une prédisposition à la sensibilisation à l'asthme, étudié dans le second article, soulignent l'importance de suivre les études expérimentales et de les comparer aux études de biosurveillance. Cependant, une analyse plus poussée de la littérature, comme celle

entreprise depuis plus d'un an par l'Anses, est essentielle pour suggérer de nouvelles approches tenant compte des données scientifiques les plus récentes.

Afin de réduire les biais potentiels dans le processus d'ERS, il serait souhaitable de mieux circonscrire les notions de faibles doses. Ce raffinement devrait être appuyé par une démarche prospective de suivis biologiques (telle l'étude NHANES⁽¹⁵⁾ aux États-Unis) et de soutien à la recherche fondamentale notamment en matière d'analyses des mécanismes d'action et de modélisation PBPK⁽¹⁶⁾. Le processus du règlement REACH⁽¹⁷⁾ offre une bonne occasion de dialogue entre les différentes parties impliquées dans le processus d'ERS. Ce dialogue pourrait suggérer de nouvelles approches d'analyse, déboucher vers une approche concertée qui inclurait les doses faibles, dans l'objectif ultime de protéger les populations en lien avec la mission de santé publique de prévention et protection.

Lexique

- (1) BPA: bisphénol A.
- (2) PE: perturbateur endocrinien.
- (3) MoA: modes d'action.
- (4) NOAEL: dose sans effet néfaste observé.
- (5) EFSA: European Food Safety Authority.
- (6) E₂: 17-β-œstradiol.
- (7) GLUT: transporteur du glucose.
- (8) IRS: substrat de récepteur à insuline (insulin receptor substrate).
- (9) PND: Post natal day: jour post-natal.
- (10) Th2: réponse immunitaire de type Th2.
- (11) GD: jour de gestation.
- (12) IL4: Interleukine 4.
- (13) UGT: Enzyme UDP-glucuronosyltransférase.
- (14) ERS: évaluation des risques sanitaires.
- (15) NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey.
- (16) PBPK: modélisation pharmacocinétique à base physiologique.
- (17) REACH: enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques.

Publications de référence

- (1) Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* doi:10.1210/er.2011-1050.
- (2) Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24 (2):139-77.
- (3) Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, *et al.* Bisphenol-A acts as a potent estrogen *via* non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2012;355 (2):201-7.

- (4) **Rubin BS.** Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127 (1-2):27-34.
- (5) **European Food Safety Authority (EFSA).** 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) 2006; (75 pages). <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/428.pdf> (consulté le 15 avril 2012).
- (6) **Alcorn J, McNamara PJ.** Pharmacokinetics in the newborn. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55 (5):667-86.

Revue de la littérature

- (7) **Maranghi F, Mantovani A.** Targeted toxicological testing to investigate the role of endocrine disruptors in puberty disorders. *Reprod Toxicol* 2012;33 (3):290-6.

Autres publications identifiées

Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, et al. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl* 2012;35 (3):303-16.

Cet article vise à évaluer les effets sur la différenciation sexuelle mâle du rat de mélanges de treize substances chimiques actives pertinents du point de vue environnemental, dont le BPA. Des composés anti-androgéniques ainsi que des substances œstrogéniques, deux catégories pouvant induire une altération de la différenciation sexuelle mâle, ont été étudiés. Ce travail fait référence à la notion de mélanges qui vont fréquemment exacerber les effets rapportés. De plus, il s'intéresse aux effets cumulés de mélanges de substances plutôt qu'à l'analyse du BPA spécifiquement.

Cet article n'a pas été retenu en raison du désir d'uniformiser la note en traitant que de BPA dans un contexte de faibles doses.

Quignot N, Arnaud M, Robidel F, et al. Characterization of endocrine-disrupting chemicals based on hormonal balance disruption in male and female adult rats. *Reprod Toxicol* 2012;33 (3):339-52.

Cet article analyse les effets de différents pesticides et du BPA, reconnus comme PE, sur les fonctions reproductives du rat en fonction de l'équilibre hormonal entre œstrogènes et androgènes. Plusieurs critères d'évaluation complémentaires ont mis en évidence que les voies de signalisation gonadiques sont impliquées dans la perturbation endocrinienne. Il existe toutefois des divergences entre la caractérisation de ces composés in vitro et leurs effets in vivo. Cela démontre la pertinence de diversifier les paramètres d'analyse pour réaliser une bonne évaluation de risques.

Cet article n'a pas été retenu pour la note car les 4 composés ont été analysés à une seule forte dose chacun, de 100 à 200 mg de composé/kg de poids corporel/j.

Lopez-Casas PP, Mizrak SC, Lopez-Fernandez LA, et al. The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reprod Toxicol* 2012;33 (1):106-15.

Cet article étudie les effets de quatre PE dont le BPA, comparativement à E₂ sur le transcriptome dans les testicules de rats. Les composés ont été administrés par l'eau de boisson à différentes périodes du développement. Aucun effet du BPA n'est rapporté sur le profil de transcription des gènes.

Cet article n'a pas été retenu, car il ne se positionne pas explicitement par rapport aux notions de faible dose ou de mélange. La plus petite dose de BPA utilisée est de 160 µg de BPA/kg poids corporel/j, c'est-à-dire supérieure à celles utilisées dans les articles sélectionnés; il n'était donc pas d'un apport substantiel comparativement aux articles choisis.

Nagyri G, Valkusz Z, Radacs M, et al. Behavioral and endocrine effects of chronic exposure to low doses of chlorobenzenes in Wistar rats. *Neurotoxicol Teratol* 2012;34 (1):9-19

Cet article analyse les effets comportementaux d'une exposition à long-terme (1 à 3 mois) d'un mélange de 2 chlorobenzène (hexachlorobenzène et 1,2,4-trichlorobenzène) administrés à des rats adultes par gavage gastrique à une dose subtoxique de 1 µg composé/Kg de poids corporel/j chacun. Les analyses comportementales ont été complétées par des mesures biochimiques de différents marqueurs de stress. Des altérations sont rapportées suite au traitement, notamment de la libération de la vasopressine et de l'oxytocine.

Cet article apporte des données intéressantes sur un système peu étudié dans le contexte de la perturbation endocrinienne. Il n'a pas été retenu pour la note, car les composés étudiés sont d'une autre classe que le BPA. De plus, le mode d'administration du traitement reflète de façon incomplète l'exposition environnementale à ces composés.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Endocrine, Low-dose, Mixture, Monotonic curve, Pesticide, Safety dose.

Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêt;
 avoir un ou plusieurs conflits d'intérêt.