

Effets des faibles doses de bisphénol A sur la fonction testiculaire et les anomalies génitales chez l'homme : difficulté de l'extrapolation des résultats des études animales à l'homme et influence des variations génétiques

Période : décembre 2012 à mars 2013

Marie-Anne ROBIN

Inserm – UMR-991 – Rennes – France

Mots clés : bisphénol A, cellules et organes humains, culture *in vitro*, cryptorchidie, faibles doses, hypospadias, perturbateurs endocriniens, polymorphisme génétique, reproduction

Le bisphénol A (BPA) suscite depuis plus d'une dizaine d'années des inquiétudes croissantes pour la santé publique. Le BPA est un perturbateur endocrinien (PE) faiblement œstrogénique qui entre dans la composition de nombreux produits tels que le revêtement intérieur des canettes en métal, le papier thermique (pour fax et tickets de caisse), les bouteilles et conteneurs en polycarbonates... Les PE agissent sur le système hormonal et peuvent potentiellement affecter les fonctions de reproduction (1) ainsi que le métabolisme (2) des organismes exposés et participer à l'apparition de cancers hormonaux-dépendants (sein, prostate, ovaire, testicule) (3). Le testicule est donc un organe particulièrement sensible au BPA et plusieurs études réalisées sur des modèles animaux (souris, poissons) suggèrent des effets néfastes à des doses jugées sûres pour la population humaine (4-6). En 2006, l'EFSA (1) avait réalisé une évaluation complète des risques associés au BPA et établi la dose journalière admissible (2) (DJA) à 0,05 mg par kilo de poids corporel et par jour, DJA reconfirmée en 2008 et 2010. En février 2012, l'EFSA a décidé d'entreprendre une réévaluation complète des risques pour l'homme associés à l'exposition au BPA par l'intermédiaire du régime alimentaire, en tenant compte également de la contribution de sources non alimentaires à l'exposition globale au BPA. La publication de cette évaluation est prévue pour mai 2013. Sur la base du principe de précaution, l'utilisation du BPA dans la fabrication des biberons a été interdite en France depuis janvier 2011. Cette interdiction s'appliquera aux autres contenants alimentaires à partir de juillet 2015. Cette note porte sur deux études réalisées sur des cultures *in vitro* d'organes fœtaux ou de cellules issues de tissus humains qui montrent des effets du BPA sur la fonction de reproduction mâle à la concentration de 10 nM (2,3 µg/L), concentration bien inférieure à la DJA (l'équivalent de la DJA pour les études *in vitro* est approximativement de 200 nM) et proche des quantités détectées dans plusieurs fluides corporels. Une revue de la plupart des études ayant mesuré le BPA dans le sang montre en effet des taux plasmatiques variant de 0,5 à 10 µg/L (7). Les deux études faisant l'objet de cette note soulignent également la difficulté de transposer à l'homme les observations faites chez les rongeurs et l'importance de la variation génétique humaine.

Effets différentiels du bisphénol A et du diéthylstilbestrol sur la fonction des cellules de Leydig fœtales d'origine humaine ou issues de rongeurs

N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme SM, Pozzi-Gaudin S, Frydman R, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V, Habert R. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One* 2012;7(12):e51579.

Résumé

Les PE sont mis en cause dans la hausse actuelle des altérations de la fonction reproductrice mâle et la question de la toxicité des

faibles doses de BPA est toujours débattue (8). Dans cette étude, les auteurs ont analysé les effets de concentrations allant de 1 pM à 10 µM de BPA sur la fonction de cellules de Leydig (3) fœtales, la période fœtale représentant une période particulièrement critique et sensible aux effets des PE. Dans ce but, des testicules fœtaux humains et de rongeurs ont été explantés et cultivés en utilisant un système de culture organotypique validé par l'équipe de René Habert (celle des auteurs) en présence ou absence de BPA pendant 1 à 3 jours. Le BPA, à la concentration de 10 nM et dès le premier jour de culture, réduit la sécrétion de testostérone de 20 % par les testicules humains et les niveaux d'une autre hormone, l'« Insulin-like 3 » (INSL3) (4), produite par les cellules de Leydig et responsable de la descente des testicules dans le scrotum. Ces effets ne

sont pas retrouvés dans les modèles rongeurs, ou seulement à des concentrations beaucoup plus élevées de l'ordre de 10 µM, indiquant que les cellules humaines sont plus sensibles que les cellules de rongeurs. Les auteurs ont ensuite comparé les effets du BPA à ceux du diéthylstilbestrol (5). Ce composé œstrogénique classique affecte la sécrétion de testostérone dans les cultures de testicules de rats et de souris, mais pas dans celles de testicules fœtaux humains. Enfin, contrairement au diéthylstilbestrol (5), l'effet du BPA sur la diminution de testostérone ne passe pas par le récepteur alpha (ERα) aux œstrogènes. Les différences inter-espèces observées dans cette étude soulèvent des inquiétudes sur l'extrapolation des données provenant de rongeurs, à l'évaluation des risques pour l'homme.

Commentaire

La plupart des études établissant une relation entre BPA et anomalies de la fonction testiculaire sont des études réalisées sur des modèles expérimentaux de rongeurs. Au sein même de ces études, il existe une grande hétérogénéité se traduisant par des résultats souvent contradictoires (9). Un des points forts de l'étude commentée dans cette note est l'utilisation d'une technologie innovante basée sur un système unique de culture organotypique de testicules fœtaux d'origine humaine leur permettant de conserver leurs fonctions pendant plusieurs jours, en particulier la sécrétion de testostérone. La diminution de la production de testostérone et du niveau d'ARN de l'INSL3 observée dans ce modèle à la suite d'une exposition à de faibles concentrations de BPA pourrait contribuer à expliquer l'augmentation des défauts congénitaux de masculinisation type hypospadias (6) et cryptorchidie (7) constatée ces dernières décennies. Cette étude contribue à montrer l'existence d'effets du BPA à de faibles concentrations compatibles avec l'exposition humaine et compare la sensibilité de l'espèce humaine à celles de la souris et du rat, qui sont les deux espèces utilisées pour les études de toxicologie réglementaire. L'exposition de la culture au BPA a duré trois jours, il serait intéressant de savoir si le modèle permet des expositions plus longues afin de se rapprocher de la situation humaine et d'être assuré que les effets observés ne sont pas transitoires. Enfin, cette étude souligne que les effets des PE induits par le BPA ne sont pas nécessairement liés à son action œstrogéno-mimétique *via* le récepteur ERα. Il serait intéressant d'utiliser des agonistes/antagonistes ou des souris KO pour d'autres récepteurs (GPR30 ou ERRγ) afin de déterminer si un récepteur, et lequel, est impliqué dans la signalisation du BPA.

Variation individuelle de la réponse génétique au bisphénol A dans des cellules fibroblastiques de prépuce provenant de patients atteints de cryptorchidie et d'hypospadias

Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T. Individual variation of the genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One* 2012;7(12):e52756.

Résumé

La cryptorchidie et l'hypospadias représentent les deux malformations génitales mâles les plus communes. Leur origine est difficile à déterminer, mais l'exposition des fœtus *in utero* à certains PE a pu être mise en cause (10, 11). Cependant, il est également possible que des variations génétiques individuelles puissent moduler les effets des PE sur ces malformations congénitales. Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des facteurs connus pour être impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans des processus physiologiques normaux, tels que le développement embryonnaire, la reproduction et le remodelage tissulaire. Dans un article antérieur, les auteurs ont montré que l'expression de l'une d'entre elles, la métalloprotéinase matricielle-11 (MMP11), était significativement plus faible chez les patients atteints d'hypospadias que chez ceux atteints de cryptorchidie et était diminuée par une exposition au BPA (12). Cela suggérait que l'implication du BPA dans le développement de l'hypospadias pouvait être liée à l'inhibition de l'expression de MMP11 (12). Dans l'article analysé, la susceptibilité individuelle à de faibles doses de BPA a été étudiée dans des cellules fibroblastiques de prépuce provenant de patients contrôles, ou de patients atteints de cryptorchidie ou d'hypospadias. Une exposition des cellules à une concentration de 10 nM de BPA diminue l'expression de MMP11 uniquement dans le groupe hypospadias et ne modifie pas celle d'un autre gène impliqué dans la progression tumorale, le récepteur à la neurotensine (NTSR1), pourtant retenu par les auteurs comme gène cible potentiel du BPA (13). L'influence du polymorphisme génétique (8) rs5000770 (G>A) du gène du récepteur aux hydrocarbures (ARNT2), déjà associé à une augmentation du risque de survenue de cryptorchidie et d'hypospadias dans une population japonaise (14), a été étudiée sur l'expression des deux gènes retenus, MMP11 et NTSR1. Les résultats montrent que l'expression de MMP11 n'est pas modifiée alors qu'une expression différentielle de NTSR1 est observée en réponse à 10 nM de BPA en fonction du génotype rs5000770 chez les patients atteints d'hypospadias. Cela suggère que la variabilité de la susceptibilité génétique aux effets des PE pourrait contribuer à la survenue de l'hypospadias chez certains individus.

Commentaire

L'étude analysée, en utilisant des cellules issues de tissus d'enfants atteints d'hypospadias (n = 21), démontre qu'il existe une modulation différente du gène NTSR1, mais pas de MMP11, en fonction du génotype considéré en réponse à une exposition à de

faibles concentrations de BPA. Cependant les niveaux de variation restent faibles. De plus, les effectifs des autres groupes étudiés, en particulier le groupe contrôle, sont faibles et mériteraient d'être complétés (contrôles n = 5 et cryptorchidies n = 8). Dans un article précédent, outre MMP11, les auteurs avaient identifié d'autres gènes cibles régulés positivement ou négativement par une exposition à de faibles concentrations de BPA (0,01 et 10 nM). Il serait intéressant de déterminer si l'expression de ces gènes est modulée en fonction du génotype rs5000770. De la même façon, il serait intéressant de voir si les effets du BPA sur l'expression de NTR51 varient en fonction d'autres polymorphismes qui ont pu être impliqués dans la survenue de l'hypospadias, comme des polymorphismes du récepteur aux androgènes (15), d'enzymes du métabolisme des stéroïdes (16) ou de cytochromes P450 (14).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces deux études, réalisées sur des tissus d'origine humaine, contribuent à la connaissance des effets PE du BPA sur la fonction testiculaire chez l'homme. Il en ressort que les faibles doses, de l'ordre de celles auxquelles est exposée la population générale, peuvent avoir un impact sur la production de testostérone pendant la période de masculinisation du fœtus. La première étude souligne la difficulté de transposer les effets observés chez l'animal, à l'homme et, dans ce cas précis, l'espèce humaine serait plus sensible que les espèces de rongeurs. La seconde montre que certains polymorphismes génétiques pourraient prédisposer à des malformations congénitales de l'appareil reproducteur mâle en réponse à une exposition au BPA. Le grand nombre d'études sur le BPA, qu'elles soient épidémiologiques, expérimentales sur animaux ou sur cellules d'origine humaines (comme les deux études analysées dans cette note), indiquent un risque potentiel lié à l'exposition à des doses de BPA jusque-là considérées comme sûres. Malgré la difficulté de transposer les effets observés à l'Homme, la multiplicité des arguments en défaveur du BPA conduit les pouvoirs publics à la prudence. Il est à signaler que la rédaction de cette note coïncide avec la sortie de l'avis de l'Anses sur l'évaluation des risques du BPA pour la santé humaine (17), qui attire l'attention sur deux populations particulièrement à risque, les femmes enceintes et les personnes manipulant du papier thermique, ainsi que sur une réévaluation de la DJA.

GENERAL CONCLUSION

Both studies analyzed here, carried out on human tissue, advance understanding of the endocrine disruptor effects of BPA on testicular function in humans. It appears that low doses close to those the general population is exposed to can have an impact on testosterone production during fetus masculinization. The first study highlights the difficulty of transposing effects observed in animals to humans and in this case, the human species would be more sensitive than rodent species. The second study shows that genetic polymorphisms may predispose to congenital malformations of the male reproductive tract in response to BPA exposure. The large number of studies on BPA, whether epidemiological or experimental on animals or human cells (as studies analyzed in this note), indicates a potential risk of exposure to doses of BPA hitherto considered safe. Despite the difficulty of transposing the observed effects to humans, the multiple arguments against BPA led public authorities to be cautious. It should be pointed out that the drafting of this note coincides with the release of ANSES BPA report on human health risk assessment (17), which draws attention to two particularly vulnerable populations, pregnant women and persons handling thermal paper, and to the need of reevaluating the admissible daily intake (ADI).

Lexique

- (1) EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments. Elle est chargée de l'évaluation des risques relatifs à la sécurité des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale.
- (2) DJA : dose journalière admissible (en anglais : Acceptable Daily Intake ou ADI). Elle représente la quantité d'une substance qu'un individu peut théoriquement ingérer quotidiennement sans risque pour sa santé.
- (3) Cellules de Leydig : les cellules de Leydig, aussi nommées cellules interstitielles, sont situées dans les testicules et produisent 95 % de la testostérone chez l'homme. Elles contrôlent le développement et le maintien des caractères sexuels primaires et secondaires.
- (4) INSL3 : hormone impliquée dans la descente testiculaire dans le scrotum (Insulin-like 3).
- (5) Diéthylstilbestrol : produit de synthèse aux propriétés œstrogéniques puissantes. Commercialisé pour réduire les avortements à répétition et les accouchements prématurés, il entraîna des anomalies génitales chez les enfants nés de mères l'ayant pris pendant leur grossesse.
- (6) Hypospadias : malformation du fœtus masculin, qui se manifeste par l'ouverture de l'urètre sur la face inférieure du pénis au lieu de son extrémité.
- (7) Cryptorchidie : défaut de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum.

- (8) Polymorphisme génétique : variation entre individus dans la séquence du génome. Ces variations qui rendent compte des différents allèles dans une population sont normales et ne sont généralement pas pathogènes.

Publications de référence

- (1) Schug TT, Janesick A, Blumberg B, et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127(3-5):204-15.
- (2) Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, et al. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2012;354(1-2):74-84.
- (3) De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012 (2012), Article ID 713696, 52 pages. doi:10.1155/2012/713696.
- (4) Xi W, Wan HT, Zhao YG, et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di (2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 2011;19(7):2515-27.
- (5) LaRocca J, Boyajian A, Brown C, et al. Effects of *in utero* exposure to Bisphenol A or diethylstilbestrol on the adult male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2011;92(6):526-33.
- (6) Hatef A, Zare A, Alavi SM, et al. Modulations in androgen and estrogen mediating genes and testicular response in male goldfish exposed to bisphenol A. *Environ Toxicol Chem* 2012;31(9):2069-77.
- (7) Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010;118(8):1055-70.
- (8) Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;33(3):378-455.
- (9) Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, et al. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009;30(1):75-95.
- (10) Toppari J, Virtanen HE, Main KM, et al. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(10):910-9.
- (11) Vidaeff AC, Sever LE. *In utero* exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod Toxicol* 2005;20(1):5-20.
- (12) Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, et al. Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One* 2012;7(5):e36711.
- (13) Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, et al. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One* 2009;4(1):e4223.

- (14) Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, et al. Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 2012;57(7):434-41.
- (15) Adamovic T, Nordenskjöld A. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modifies the risk for hypospadias in Caucasians. *BMC Med Genet* 2012;13:109.
- (16) van der Zanden LF, Galesloot TE, Feitz WF, et al. Exploration of gene-environment interactions, maternal effects and parent of origin effects in the etiology of hypospadias. *J Urol* 2012;188(6):2354-60.
- (17) Anses (2013). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine Tome 1. Rapport d'expertise collective.

Revue de la littérature

- 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.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reprod Toxicol* 2013;38C:1-15. doi:10.1016/j.reprotox.2013.02.002.
- Thigpen JE, Setchell KD, Kissling GE, et al. The estrogenic content of rodent diets, bedding, cages, and water bottles and its effect on bisphenol a studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013;52(2):130-41.
- Meeker JD. Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2012;166(10):952-8.
- DiVall SA. The influence of endocrine disruptors on growth and development of children. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013;20(1):50-5.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 2012;50(10):3725-40.
- Knez J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod Biomed Online* 2013; doi:pil: S1472-6483(13)00069-2. 10.1016/j.rbmo.2013.02.005.

Autres publications identifiées

- Qiu LL, Wang X, Zhang XH, et al. Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicol Lett* 2013; doi:pil: S0378-4274(13)00109-4. 10.1016/j.toxlet.2013.03.011.
- Cette étude montre aussi des effets du BPA à faibles doses (0,5 µg à 5 mg par kilo et par jour) sur la fonction de reproduction mâle chez le rat, mais après une exposition chronique à l'âge adulte. Ces effets concernent des anomalies de la spermatogénèse liées à une diminution de l'expression du récepteur aux androgènes. Ce travail est intéressant car il est basé sur une exposition des rats au BPA pendant huit semaines, ce qui peut se rapprocher d'une exposition chronique humaine. Il montre également que des rats adultes peuvent être sensibles aux faibles doses de BPA.

Jin P, Wang X, Chang F, et al. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J Biomed Res* 2013;**27**(2):135-44.

Dans cette étude, des rats mâles adultes ont été traités par une dose de BPA de 2 µg par kilo et par jour pendant 14 jours. Il ne s'agit pas réellement d'une étude chronique, mais l'intérêt réside ici encore dans la faible dose utilisée. Rappelons que la DJA est de 50 µg par kilo et par jour. Cette exposition a résulté en une diminution du nombre de spermatozoïdes et de cellules germinales, associée à une diminution d'hormones dont la testostérone et à une activation de l'apoptose.

Sheng ZG, Huang W, Liu YX, et al. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression.

Toxicol Appl Pharmacol 2013;**267**(1):88-94.

Cette étude a recherché comment de faibles concentrations de BPA de l'ordre du nanomolaire stimulaient la prolifération des cellules GC1 de spermatogonies de souris. Il est actuellement débattu que les effets à faibles doses du BPA passent par les récepteurs aux œstrogènes. Ici, les auteurs montrent que le récepteur GPR30 pourrait jouer un rôle dans la prolifération de cellules germinales mâles exposées au BPA.

Castro B, Sánchez P, Torres JM, et al. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5α-reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One* 2013;**8**(2):e55905.

Cette étude établit une relation entre BPA à faibles doses (25 µg à 600 µg par kilo et par jour) et incidence croissante du cancer de la prostate et de l'hypertrophie bénigne de la prostate, chez le rat adulte. En effet, l'expression de l'ARN messager de plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse de la dihydrotestostérone et de l'œstradiol est modifiée sous l'effet de l'exposition au BPA. De plus, le rapport œstradiol/testostérone est augmenté dans le plasma des rats exposés, ce qui est aussi le cas dans les maladies de la prostate.

Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

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