



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 5103

To cite this version :

Levret-Corjon, Anne-Sophie. *Mécanisme d'action du bisphénol A sur la fonction gonadotrope chez le brebis prépubère*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2011, 59 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

Mécanisme d'action du bisphénol A sur la fonction gonadotrope chez la brebis prépubère

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Anne-Sophie LEVRET-CORJON
Née, le 11 Octobre 1985 à TOULOUSE(31)

Directeur de thèse : Mme Véronique GAYRARD

JURY

PRESIDENT :

M. Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Véronique GAYRARD
Mme Nicole HAGEN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mme Catherine VIGUIE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^oCLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2^oCLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

DEDICACES

A Monsieur le Professeur Jean Parinaud

De la faculté de médecine de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Pour votre disponibilité, votre réactivité et votre obligeance,

Merci

A Mme le Docteur Véronique Gayrard

Qui nous a fait l'honneur d'être notre maître de thèse,

Pour votre aide précieuse lors des manipulations et de la rédaction de cette thèse,

Pour votre infinie patience, votre gentillesse et votre écoute,

Un grand Merci

A Mme le Docteur Nicole Hagen-Picard

Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être membre de notre jury de thèse,

Pour votre aide lors des manipulations et votre bonne humeur,

Merci

A Mademoiselle Séverine Collet

Pour son aide lors des manipulations, du traitement des informations et de la rédaction,

Pour sa bonne humeur permanente et sa gentillesse,

Un grand Merci.

Aux nombreuses personnes ayant été sollicitées pour la mise en page de cette thèse
Ma maman, mon papa, mon frère, mon cousin Stéphane et les autres personnes qui se sont
trouvées au mauvais endroit au mauvais moment.

Un grand merci d'avoir résolu ce casse-tête informatique à ma place, de m'avoir fait gagner
un temps précieux et d'avoir préservé mon quota de bonne humeur. Vive Word.

A ma maman

Toujours présente pour m'aider et me conseiller, que ce soit lors de la réalisation de
documents, la recette des lasagnes ou pour tout autre aspect de ma vie. Je ne sais pas comment
je me débrouillerais sans toi.

A mon papa

Le boss(e) des maths qui m'a souvent donné mal à la tête avec ses explications, mais qui a
finalement réussi à me faire rentrer les « x » et les « y » dans le crâne (de gré ou de force).
C'est grâce à toi que je n'ai jamais pris de retard.

Avec tes bêtises et ta bonne humeur, tu m'as souvent remonté le moral. Même si tes blagues
sont souvent nulles et que je dois toujours attendre 30 minutes quand tu fais la caisse, j'ai
beaucoup de chance de t'avoir comme papa.

A mon frère Loïc

A tous les bons moments passés ensemble, les fou-rires, les vacances, à tous les moments où
tu étais près de moi. A ton gros coup de pouce en maths et physique quand papa a déclaré
forfait. Tu es le meilleur frère dont je puisse rêver.

A Mimi

Heureusement que tu es là, aide inestimable pour le repassage et surtout pour détourner les
moqueries de moi. Tu es une cible idéale et on en profite peut-être un peu trop, mais cela met
toujours beaucoup d'ambiance quand tu es avec nous. Et heureusement, tu peux te débrancher
discrètement,... sauf qu'on te surveille maintenant.

A Mamie et Daddy

Toujours prêts à nous accueillir, à nous emmener à la mer « à la pêche aux crevettes », à nous
cuisiner des plats gastronomiques (voire astronomiques en quantité) avec les produits du
jardin. Pour tous les bons moments passés près de vous, merci.

A Marie-Ange et Philippe

Presque plus parents que oncle et tante, vous me suivez pas à pas, toujours à prendre de mes
nouvelles et à vouloir m'aider. Si je suis véto aujourd'hui, c'est aussi grâce à vous.

A Kiki

Pour les grandes discussions et les fous-rires qu'on s'est tapés, pour les cours de danse...
Merci d'avoir gardé ton côté « adolescente déjantée », près de toi je ne m'ennuie jamais.
Merci aussi pour tes tentatives désespérées de m'inculquer les bases de la cosmétique, je crois
avoir compris à quoi sert une crème hydratante, ce n'est pas foutu...

A Marie Paule et Jean Claude

Merci pour votre accueil et votre soutien.

A mes autres oncles et tantes,

Je n'ai pas la chance de vous voir souvent, mais je sais pouvoir toujours compter sur vous. Merci.

A mon cousin Flavien

Cousin, confident... tu es là à toute heure du jour et de la nuit. Avec toi je peux me montrer telle que je suis vraiment, sans me cacher, car tu ne me juges jamais. Tu es toujours là pour me soutenir, pour me faire rire, me faire danser, pour faire un concours de photos mytho... avec toi je n'ai même pas peur des coups de gueule car notre amitié est bien plus forte que toutes les vacheries que je pourrais te sortir. Merci d'être là.

A mon cousin Stéphane

Presque plus frère que cousin, compagnon irremplaçable pour me faire courir au squash ou pour formater mon ordi, je suis contente que tu sois sur Toulouse.

A mes amis de l'ENVT, de l'ENVL ou d'ailleurs

Tous à votre manière, vous m'avez fait avancer et m'avez créée telle que je suis (pour le meilleur et pour le pire, d'ailleurs). Vous avez supporté mon mauvais caractère, m'avez fait rire, m'avez fait faire plein de bêtises... j'espère que ce sera le cas toute notre vie.

A Damien

Compagnon idéal pour se faire massacrer au squash ou tout autre jeu de balle... ma vengeance sera terrible. J'espère passer de nombreuses années près de toi.

Pour ma chienne Kaname

Grâce à qui je fais largement mes 30 minutes de marche par jour, même quand j'ai prévu d'en faire 10... Grâce à qui je travaille ma voix tous les jours. Un Amour à 95%... mais gare aux 5% restant.

Pour ma Chatte Gargamelle

« La grosse », qui m'a permis de tester toutes les techniques d'alimentation. C'est dur d'avoir une maitresse véto...

SOMMAIRE

INTRODUCTION	17
I. LE BISPHEENOL A	19
I.1. Utilisation du Bisphénol A et présence dans l'environnement.....	19
I.2. Contamination humaine par le Bisphénol A	19
I.2.1. Voies de contamination.....	19
I.2.2. Exposition interne au BPA.....	20
I.3. Activité oestrogénique du Bisphénol A	20
I.3.1. Propriétés physico-chimiques	20
I.3.2. Effets des œstrogènes sur l'organisme :.....	21
I.3.3. Effets du Bisphénol A sur l'organisme	23
I.3.4. Potentiels oestrogéniques comparés du Bisphénol A et de l'œstradiol	24
I.4. Données réglementaires sur le BPA	24
I.4.1. Etablissement de la dose journalière admissible (DJA)	24
I.4.2. Polémique autour de la DJA	25
I.4.3. Mesures prises par les Etats	26
I.5. Contexte de notre étude.....	26
I.5.1. Présentation du modèle de la brebis prépubère ovariectomisée	26
I.5.2. Résultats obtenus avec ce modèle	27
I.5.3. Objectifs de l'étude	29
II. REALISATIONS EXPERIMENTALES	31
II.1. Objectifs.....	31
II.2. Animaux / système biologique.....	31
II.3. Déroulement des expériences :.....	31
II.3.1. Expérience 1 : Effets d'une exposition chronique au Bisphénol A sur la sécrétion de LH et sur la sensibilité de l'hypophyse au GnRH	31
II.3.2. Expérience 2 : Mécanismes d'action du Bisphénol A sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, et étude d'une possible synergie avec l'œstradiol	33
II.4.1. Produits et préparation	35
II.4.2. Réalisation des administrations	36
II.4.3. Réalisation des prélèvements	36
II.4.4. Traitements des échantillons et dosages.....	36
II.4.5. Analyse des données	37
III. RESULTATS	39
III.1. Effet d'une exposition chronique sur la fonction gonadotrope : experience 1	39
III.1.1. Résultats	39
III.1.2. Discussion	45
III.2. Mécanismes d'action du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire	47
III.2.1. Résultats	47
III.2.2. Discussion	50

III.3.	Etude d'une possible synergie du BPA et de l'œstradiol sur la sécrétion de LH (essai pilote 2)....	51
III.3.1.	Résultats	51
III.3.2.	Discussion	52
IV.	CONCLUSION.....	55
V.	BIBLIOGRAPHIE.....	57

Table des ILLUSTRATIONS

Fig 1.	Structure du bisphénol A	20
Fig 2.	Structure de l'œstradiol	20
Fig 3.	Fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire	22
Fig 4.	Inhibition de la fréquence des pulses de LH 48h après le début d'une perfusion d'œstradiol, en fonction de la concentration plasmatique d'œstradiol.	27
Fig 5.	Inhibition de la fréquence des pulses de LH 48h après le début d'une perfusion de BPA, en fonction de la concentration plasmatique en BPA.....	28
Fig 6.	Résumé du protocole de l'expérience 1 visant à évaluer les effets d'administrations répétées de BPA sur la sécrétion de LH.	33
Fig 7.	Evolution des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) avant le début des traitements chez une agnelle ovariectomisée représentative.....	39
Fig 8.	Evolution des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) après 6 semaines de traitement au BPA (3.5mg/kg 2 fois par semaine), DES (0.175mg/kg 2 fois par semaine) ou solvant chez 2 agnelles représentatives par lot.	40
Fig 9.	Evolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) après 7 semaines de traitement au BPA (3.5mg/kg, 2 fois par semaine), DES (0.175mg/kg, 2 fois par semaine) ou solvant chez 2 ou 3 agnelles représentatives par lot.	41
Fig 10.	Evolution sur 24h des concentrations sériques en BPA après la première et la dernière administration IM de 3.5 mg/kg de BPA.....	42
Fig 11.	Utérus prélevé sur une brebis traitée au BPA.	44
Fig 12.	Evolution du poids de l'utérus (en pourcentage du poids de l'animal) \pm écart type selon le traitement (solvant, DES ou BPA).	44
Fig 13.	Mamelle d'un animal traité au DES.....	45
Fig 14.	Evolution du poids moyen de la mamelle (en pourcentage du poids de l'animal) \pm écart type selon le traitement (solvant, DES ou BPA).	45
Fig 15.	Evolutions des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) pendant 6h après une injection intraveineuse de Buséréline (réceptal®) chez les brebis traitées au BPA (droite) ou au solvant (gauche).	47
Fig 16.	Concentrations plasmatiques moyennes de LH et écart types durant les 6h suivant une administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 ou 10 μ g/kg des brebis du lot traité au BPA	49
Fig 17.	Concentrations plasmatiques moyennes de LH et écart types durant les 6h suivant une administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 ou 10 μ g/kg pour le lot contrôle.....	49
Fig 18.	Concentrations plasmatiques de LH durant 6h avant et près 48h de perfusion simultanée de BPA et de E2 aux taux de 0.34 μ g/(kg.min) et 0.02 ng/(kg.min)	52

Liste des TABLEAUX

Tableau 1.	<i>Puissances comparées des activités oestrogéniques du BPA et de E2 dans différents modèles moléculaires et cellulaires.</i>	24
Tableau 2.	<i>Plan en cross-over équilibré permettant de répartir les doses de GnRH reçues par les brebis. (0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 µg/kg)</i>	34
Tableau 3.	<i>Paramètres de la sécrétion de LH (moyenne ± ET) pour chaque lot d'animaux avant le début des traitements, et paramètres moyens estimés pour l'ensemble des animaux avant le début des traitements</i>	39
Tableau 4.	<i>Paramètres de la sécrétion de LH (moyenne ± ET) pour chaque lot d'animaux au bout de 6 semaines de traitement.</i>	41
Tableau 5.	<i>Paramètres de la sécrétion de LH (moyenne ± ET) pour chaque lot d'animaux après 7 semaines de traitement</i>	42
Tableau 6.	<i>Paramètres pharmacocinétiques du Bisphénol A déterminés après la première et après la dernière administration de BPA</i>	43
Tableau 7.	<i>Concentrations moyennes de BPA (et écarts types associés) obtenues chaque semaine de l'expérience, 48h après une administration de BPA</i>	43
Tableau 8.	<i>Paramètres de la libération de LH (moyenne ± ET) pour les animaux traités au BPA et les animaux contrôles en fonction de la dose de Busérelina</i>	48
Tableau 9.	<i>Récapitulatif des paramètres de la libération de LH (moyenne ± ET) en fonction du traitement (BPA vs contrôle) et de la dose de GnRH</i>	50
Tableau 10.	<i>Récapitulatif des paramètres de la libération de LH (moyenne ± ET) avant et après 48h de perfusion aux taux de 0.34 µg/(kg.min) de BPA et 0.02 ng/(kg.min) de E2</i>	52

Liste des acronymes et abréviations

AESA :	Agence Européenne pour la Sécurité des Aliments
ANR :	Agence Nationale de la Recherche
AUC :	Area Under the Concentration curve (aire sous la courbe de concentration)
BPA :	Bisphénol A
BSA :	Bovine Serum Albumin
Cmax :	Concentration maximale
DES :	DiEthylStilbestrol
DJA :	Dose Journalière Admissible
E2 :	Oestradiol
EC ₅₀ :	Concentration plasmatique d'une substance induisant 50% de son efficacité
EPA :	Agence américaine de Protection de l'Environnement
ER :	Estrogen Receptor (récepteurs aux œstrogènes)
ER α :	Estrogen Receptor alpha
ER β :	Estrogen Receptor Beta
FSH :	Follicle Stimulating Hormone
GnRH :	Gonadotropin Releasing Hormone (gonadolibérine)
GPR 30 :	G-protein coupled receptor 30 (récepteur couplé à une protéine G n°30)
IC ₅₀ :	Concentration permettant d'obtenir 50% d'inhibition
LH :	Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
LOAEL :	Lowest Observed Adverse Effect Level (plus faible dose testée ayant des effets délétères sur l'organisme)
LOQ :	Limit Of Quantification (limite de quantification du dosage)
OMS :	Organisation Mondiale pour la Santé
SERM :	Selective Estrogen Receptor Modulator (modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes)
SHBG :	Sex Hormone Binding Globulin (protéine de liaison des hormones sexuelles : testostérone, œstradiol...)

INTRODUCTION

Le développement de l'industrie depuis le 18^{ème} siècle a profondément transformé le mode de vie de nos civilisations. Cela a permis d'améliorer notre confort, de consommer une nourriture sans dangers biologiques, d'augmenter fortement l'espérance de vie, de lutter de manière plus efficace contre les maladies... Aujourd'hui, au quotidien, des produits issus de l'industrie sont utilisés.

Depuis une vingtaine d'années, des recherches sont menées afin d'évaluer l'innocuité de ces produits pour la santé humaine. En effet, ils contiennent de nombreuses molécules issues de la chimie n'existant pas dans le monde vivant : les xénobiotiques. Dans cette catégorie entrent notamment les pesticides, des médicaments, des substances contenues dans les plastiques... Certaines de ces molécules peuvent potentiellement être toxiques pour l'organisme.

De nombreux composés comme des pesticides ou des produits de la plasturgie sont soupçonnés d'être des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire « des agents exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme » selon l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA).

L'interaction de ces xénobiotiques avec les hormones de l'organisme pourrait avoir des effets néfastes sur la santé humaine puisque celles-ci jouent un rôle essentiel dans l'organisme (fonctionnement cardiaque, métabolisme cellulaire, apport de l'énergie aux cellules, fonction de reproduction,...).

Parmi les composés les plus étudiés se trouve le Bisphénol A qui a été l'objet de mon projet. C'est un perturbateur endocrinien issu de la plasturgie, de type œstrogène-mimétique, qui à ce titre peut interférer avec la fonction de reproduction.

Plusieurs études épidémiologiques sur le sujet suggèrent l'implication des xénobiotiques œstrogène-mimétiques environnementaux (ou xœstrogènes) dans l'incidence accrue de puberté précoce (15), de pathologies de la reproduction comme les cancers du sein (13), de la prostate et des testicules, ou encore de diminution de la qualité et de la quantité du sperme (7).

Dans une première partie bibliographique, j'évoquerai quelques données sur le Bisphénol A : son utilisation dans la plasturgie, la contamination humaine en résultant ainsi que ses effets sur l'organisme. Je présenterai aussi le modèle expérimental de la brebis prépubère ovariectomisée, support de cette étude, ainsi que les résultats précédemment obtenus avec ce modèle.

Dans une deuxième partie, je présenterai les réalisations expérimentales auxquelles j'ai contribué et qui avaient pour objectifs :

- Evaluer les effets d'une exposition chronique au BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ainsi que la capacité d'accumulation du BPA dans l'organisme (expérience 1)
- Identifier le mécanisme d'action du BPA sur la fonction gonadotrope à travers l'évaluation des effets du BPA sur la réponse hypophysaire à la gonadolibérine (GnRH) (expériences 1 et 2)

- Déterminer si le BPA et l'œstradiol peuvent agir en synergie sur la fonction gonadotrope (expérience 2)

Dans ma troisième partie, je présenterai les résultats obtenus dans les différentes expériences, et mettrai en avant les conclusions pouvant en être tirées en m'appuyant sur des résultats obtenus par d'autres équipes.

I. LE BISPHENOL A

I.1. UTILISATION DU BISPHENOL A ET PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT

Le Bisphénol A (BPA, [2,2-bis(4-hydroxydiphényl)propane], C₁₅H₁₆O₂) est un monomère des plastiques de type polycarbonates et des résines epoxy.

Les polycarbonates sont des plastiques transparents, très résistants, isolants, capables de supporter des chaleurs élevées et de se déformer sans se rompre. C'est pour cela qu'ils sont utilisés dans de nombreux domaines : l'optique (lentilles de contact, optiques de phares, vitres blindées), l'industrie agroalimentaire (bouteilles d'eau et nombreux autres emballages), l'électronique (composants informatiques), les constructions (murs insonorisants), la musique (CDs et DVDs) (18).

Les résines epoxy sont utilisées comme colles ou comme revêtements. Ce sont des colles très puissantes sur de nombreux matériaux comme le bois, le verre, la porcelaine ou le métal. Une fois sèches, elles constituent un revêtement étanche, rigide, et qui ne réagit plus avec l'oxygène et les aliments. Ces propriétés sont utilisées pour les constructions (revêtements de sols industriels, colles, revêtements intérieurs des canalisations d'eau), l'industrie alimentaire (revêtement intérieur des canettes, boîtes de conserve et couvercles métalliques), l'informatique (circuits imprimés), pour l'industrie nautique (création et réparations de bateaux, planches de surf) (18).

Avec une production supérieure à 3 millions de tonnes par an (soit 1.75kg/personne/an dans l'union européenne), le bisphénol A est l'un des composés chimiques les plus utilisés au monde, toutes molécules confondues. (48).

Le BPA est omniprésent dans notre environnement : il a été retrouvé dans la poussière (concentration moyenne de 553 µg/kg), l'air (0.51ng/m³), l'eau des lacs (souvent <1pg/ml, mais jusqu'à 3.6µg/ml), les résines dentaires (<2.2ng/ml), le papier recyclé (entre 0.55 et 24.1mg/kg), les lentilles de contact, certains matériaux électroniques... (45)

I.2. CONTAMINATION HUMAINE PAR LE BISPHENOL A

I.2.1. Voies de contamination

Quatre vingt dix neuf pour cent de la contamination humaine par le BPA se fait par ingestion (45). Pendant le stockage des aliments, une partie du BPA composant le contenant alimentaire est libérée par hydrolyse de la liaison ester qui lie les différents monomères, et se retrouve dans l'aliment. Ce phénomène est amplifié si l'on chauffe le récipient ou dans certaines conditions acido-basiques (23).

Le BPA peut aussi pénétrer dans l'organisme par voie transcutanée ou à travers les muqueuses (par exemple lorsqu'il est inhalé), mais ces voies sont anecdotiques.

On estime que l'exposition journalière humaine est de l'ordre de 1µg/kg/jour (36).

I.2.2. Exposition interne au BPA

De nombreuses études ont été menées afin d'évaluer le degré d'exposition des différentes populations. Celles-ci ont détecté du BPA dans les urines d'environ 95% des citoyens de l'UE, des USA, de la Corée, du Japon... (5, 36)

Le BPA est détecté dans différents fluides corporels : le sérum, le plasma, les urines, le placenta (35) et le lait maternel (45). Les concentrations sériques détectées dans la plupart des études se situent entre 0.2 et 20ng/ml, avec en moyenne 0.64ng/ml (2.8nM) chez la femme et 1.49ng/ml (6.5nM) chez l'homme sain (40). Evaluer les effets d'une telle exposition au BPA sur l'organisme constitue un véritable enjeu de santé publique.

I.3. ACTIVITE OESTROGENIQUE DU BISPHEENOL A

I.3.1. Propriétés physico-chimiques

Le BPA a une structure proche de celle des œstrogènes naturels, notamment par la présence de groupements phénol.

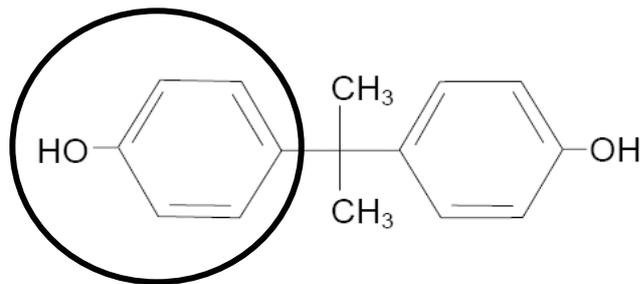


Fig 1. Structure du bisphénol A

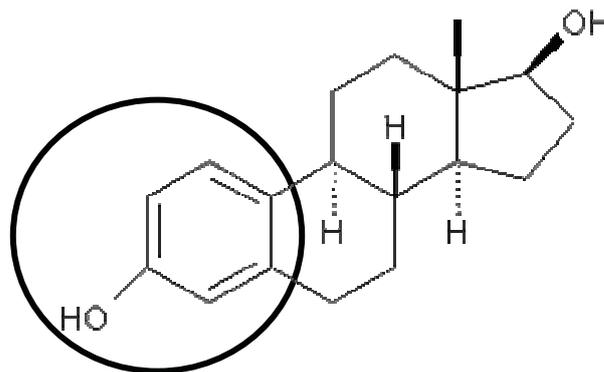


Fig 2. Structure de l'œstradiol.

Cette structure lui confère une activité œstrogène-mimétique de par sa capacité à se lier aux récepteurs aux œstrogènes (11).

I.3.2. Effets des œstrogènes sur l'organisme :

I.3.2.1. Action des œstrogènes naturels sur la fonction de reproduction

D'après le Dictionnaire médical de la librairie Nationale de Médecine des Etats-Unis, les œstrogènes sont « les différents stéroïdes naturels formés à partir de précurseurs androgènes, sécrétés principalement par les ovaires, le placenta, le tissu adipeux et les testicules, qui stimulent le développement des caractères sexuels femelles secondaires et assurent la croissance et le bon fonctionnement de l'appareil reproducteur femelle ».

Par extension, sont considérés comme œstrogènes les différents stéroïdes synthétiques ou semi-synthétiques qui miment les effets des œstrogènes naturels dans l'organisme (16).

Il existe 3 œstrogènes naturels : le 17β -œstradiol (le plus puissant), l'œstrone et l'œstriol. Leur rôle est prépondérant dans la fonction reproduction, en particulier chez les femelles, mais ils agissent aussi sur le système cardiovasculaire, sur le foie et sur l'homéostasie osseuse.

Concernant la reproduction, le rôle des œstrogènes est multiple :

- Ils permettent la mise en place des caractères sexuels secondaires.
- Au cours du cycle ovarien, ils permettent le développement de la muqueuse utérine afin de la rendre apte à recevoir l'embryon. Ils agissent aussi sur la production de la glaire cervicale et sur sa consistance, en relation avec les différentes phases du cycle.
- Ils régulent le déclenchement de l'ovulation et l'œstrus en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.
- Pendant la gestation, ils sont responsables du développement du tissu mammaire et de sa préparation pour la lactation.

Les œstrogènes agissent principalement en se liant aux récepteurs alpha et bêta aux œstrogènes ($ER\alpha$ et $ER\beta$), qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires (17).

Ceux-ci peuvent agir à travers 2 types de mécanisme :

- Action génomique, en modulant la transcription de certains gènes.
- Action non génomique, en agissant au niveau membranaire sur des transducteurs du signal. Ceux-ci peuvent aussi, à terme, influencer sur la transcription des gènes.

I.3.2.2. Œstradiol et régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire

L'axe hypothalamo-hypophysaire joue un rôle prépondérant dans la régulation de nombreuses fonctions de l'organisme en régulant la production des différentes hormones concernées. Ces dernières exercent elles-aussi un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui permet une régulation fine et rapide de la fonction de reproduction.

La figure 3 montre le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique assurant le bon déroulement du cycle œstral.

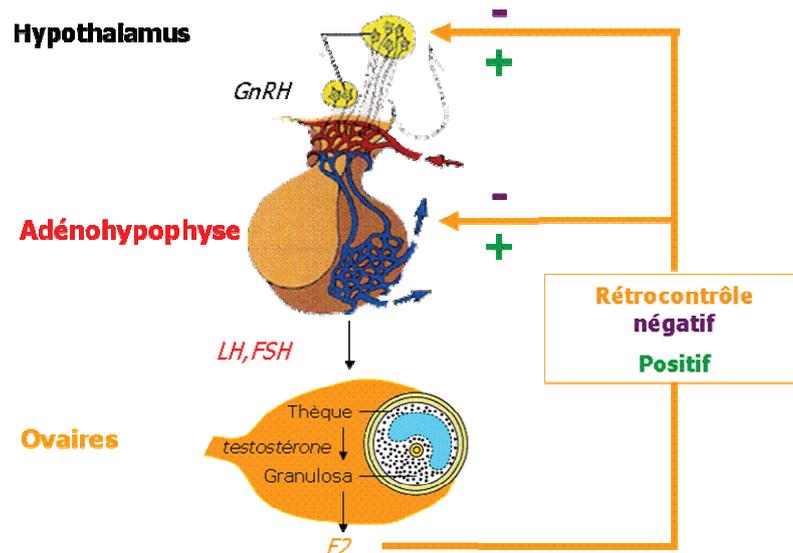


Fig 3. Fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire

La LH et la FSH sécrétées par l'hypophyse sous l'influence de l'hypothalamus vont stimuler la production des hormones sexuelles par les ovaires. Les œstrogènes ainsi sécrétés exercent un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire : négatif lors de faibles concentrations et positif lors de concentrations >200pg/ml

La libération de GnRH dans le système porte hypophysaire par les neurones de l'hypothalamus entraîne la production d'hormones gonadotropes par l'adénohypophyse (aussi appelées gonadotropines) : la Luteinizing Hormone (LH) et la Follicle Stimulating Hormone (FSH). Celles-ci vont circuler dans le sang et agir au niveau des follicules ovariens, sur 2 types de cellules :

- Les cellules de la thèque interne, sous l'influence de la LH, vont produire des androgènes et un peu d'œstradiol.
- Les cellules de la granulosa, sous l'influence principalement de la FSH, vont utiliser les androgènes thécaux pour produire de l'œstradiol.

La GnRH et les gonadotropines sont sécrétées dans l'organisme sous forme de « pulses » : leur concentration augmente brusquement, puis diminue plus lentement selon le temps de demi-vie de l'hormone (chez la brebis : environ 5 minutes pour la GnRH (42), environ 20 minutes pour la LH et 90 minutes pour la FSH (22)). L'intensité et la fréquence des pulses sont régulées pour s'adapter aux conditions physiologiques.

L'œstradiol (E2) régule la sécrétion de LH et de FSH par l'axe hypothalamo-hypophysaire, en agissant à plusieurs niveaux :

- Au niveau de l'hypothalamus (42) :
 - Lorsque sa concentration est faible, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus : la fréquence des pulses de GnRH est inversement proportionnelle à la concentration circulante de l'hormone.
 - Lorsque sa concentration dépasse un certain seuil (environ 200pg/ml) quand le follicule est prêt à ovuler, le rétrocontrôle de l'œstradiol devient positif, entraînant une décharge prolongée et massive de GnRH, à l'origine du pic préovulatoire de LH.

- Au niveau de l'hypophyse :
 - L'œstradiol inhibe transitoirement la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH à l'aide d'un mécanisme non génomique faisant intervenir le récepteur ER α (21).
 - L'œstradiol inhibe transitoirement la transcription du gène de l'activine B (molécule favorisant la sécrétion de FSH), donc la sécrétion de FSH (4).
 - Au moment de l'ovulation, une augmentation des récepteurs à GnRH de l'hypophyse rend celle-ci plus sensible à l'action du GnRH, accentuant ainsi l'intensité du pic préovulatoire de LH (22). Cette augmentation serait due à une action combinée de l'E2 et du GnRH (30).

I.3.3. Effets du Bisphénol A sur l'organisme

Le Bisphénol A agit à travers plusieurs mécanismes plus ou moins identifiés. Vis-à-vis de la fonction de reproduction chez la femelle, deux d'entre eux ont été élucidés in vitro :

- Le BPA se lie aux récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER) ER α et ER β , avec une affinité 6.6 fois plus élevée pour ER β que pour ER α (24). Différentes actions peuvent résulter de l'activation de ces récepteurs : une action non génomique (action rapide), ou une action génomique (effet plus long à mettre en place). De plus, il a été montré en analysant les transcriptions que le BPA agissait au niveau génomique sur un gène, HOXC6, appartenant à la famille des gènes HOX (14,51), ce qui n'est pas le cas de l'œstradiol. Le gène HOXC6 contrôle la transcription des cellules lors du développement en fonction de leur position sur l'axe antéropostérieur. Ainsi, grâce au gène HOXC6, une cellule « connaît » sa position dans l'embryon et son rôle futur, et exprime des gènes adaptés. Une modification de la transcription du gène HOXC6 induirait des modifications de la glande mammaire chez la souris (14).
- Le BPA se lie également à des récepteurs membranaires aux œstrogènes (GPR 30, mbER) ainsi qu'à d'autres récepteurs nucléaires (ERR γ) avec une affinité beaucoup plus importante que pour ER α et ER (41). Ces liaisons pourraient expliquer certains effets de faibles doses de BPA.

Le Bisphénol A, nous l'avons vu, présente une action œstrogène-mimétique. Néanmoins, son action dans l'organisme ne va pas toujours être identique à celle de l'œstradiol. Dans certains tissus, il aura un rôle agoniste des œstrogènes, et dans d'autres il aura un rôle antagoniste (51) : ces caractéristiques le font entrer dans la catégorie des « modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes » (SERM). Kurosawa et al. ont démontré que le BPA a une activité obligatoirement agoniste des œstrogènes quand il agit sur le récepteur ER β , et une activité mixte (agoniste ou antagoniste selon les cas) lorsqu'il agit via le récepteur ER α (25).

Par exemple, l'action du BPA sur les cellules osseuses tend à diminuer la densité osseuse, alors que les œstrogènes ont un effet opposé. De même, au niveau de l'utérus de la ratte ovariectomisée, le BPA et l'œstradiol interviennent différemment sur la synthèse de récepteurs aux œstrogènes. L'œstradiol n'a pas d'action sur la synthèse de récepteurs ER α et diminue la synthèse de récepteurs ER β , alors que le BPA augmente la synthèse de récepteurs ER α et n'aura pas d'action sur la synthèse de ER β (51).

Au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, le Bisphénol A inhibe la sécrétion de LH mais ne modifie pas celle de FSH (12).

Le Bisphénol A n'interfère pas seulement avec les œstrogènes dans l'organisme. En effet, il est capable de se lier à de nombreux récepteurs : ceux des œstrogènes, mais aussi ceux des androgènes et ceux des hormones thyroïdiennes (51).

I.3.4. Potentiels oestrogéniques comparés du Bisphénol A et de l'œstradiol

Le Bisphénol A est généralement considéré comme un faible œstrogène : dans de nombreux systèmes biologiques moléculaires ou cellulaires, l'œstradiol est à peu près 1000 fois plus puissant que le BPA (Tableau 1).

Modèle	Puissance E2	Puissance BPA	Référence
Cellules MCF-7 (homme)	EC50 = 1.66 10 ⁻⁹ M	EC50 = 1.77 10 ⁻⁶ M	Olsen et al. (2003) (31)
Cellules hypophysaires rat (PR1)	EC50 = 2.47 10 ⁻¹⁰ M	EC50 = 5.07 10 ⁻⁶ M	Chun et al. (1998) (9)
Protéines de fusion GST-ER (souris)	IC50 = 2.7 10 ⁻⁹ M	IC50 = 3.1 10 ⁻⁵ M	Matthews et al. (2001) (28)
Protéines de fusion GST-ER (poulet)	IC50 = 3.2 10 ⁻⁹ M	IC50 = 7.3 10 ⁻⁶ M	Matthews et al. (2001) (28)

Tableau 1. Puissances comparées des activités oestrogéniques du BPA et de E2 dans différents modèles moléculaires et cellulaires.

L'EC50 représente la concentration de composé testé pour laquelle 50% de l'effet maximum est observé. L'IC50 représente la concentration de composé testé pour laquelle 50% de l'inhibition maximum est observée. M (molaire : mol/L)

Par exemple, il a été démontré que le bisphénol A stimule la prolifération de cellules cancéreuses mammaires humaines (MCF-7) et régule la synthèse des protéines sensibles aux œstrogènes telles que le récepteur à la progestérone. Néanmoins, sa puissance est 1000 fois inférieure (EC50 = 1.77 10⁻⁶ M) à celle de l'œstradiol (EC50 = 1.66 10⁻⁹ M).

I.4. DONNEES REGLEMENTAIRES SUR LE BPA

I.4.1. Etablissement de la dose journalière admissible (DJA)

Une étude *in vivo* réalisée en 2002 chez le rat a montré un retard de la puberté des rats exposés *in utero* au BPA à la dose journalière de 50mg/kg. Chez une des lignées de rats femelles incluses dans l'étude, un retard significatif de l'âge à la puberté chez les descendants des animaux traités a été observé par rapport aux animaux contrôles (35.3 jours vs 33.8 jours). Cet effet n'a pas été retrouvé aux doses inférieures de BPA (20µg/kg/j et 100µg/kg/j) (43). Les premières expériences réalisées sur des animaux de laboratoire ont estimé la LOAEL (plus faible dose testée ayant des effets délétères sur l'organisme) à 50mg/kg/j. Ceci a permis aux autorités réglementaires de fixer la DJA (dose journalière admissible : dose pouvant être ingérée quotidiennement sans danger pour l'homme) en 2006 à 50µg/kg/j (EFSA,2006, 36), selon l'équation ci-dessous :

DJA = LOAEL / FI

FI : facteur d'incertitude. Il a été fixé à 1000

- Facteur 10 pour prendre en compte la variabilité interindividuelle,
- Facteur 10 pour prendre en compte l'extrapolation de l'animal à l'homme,
- Facteur 10 pour estimer le rapport entre la LOAEL et la NOAEL (no observed adverse effect level) = la plus forte dose sans effet sur l'organisme.

I.4.2. Polémique autour de la DJA

Peu après l'instauration de cette DJA, des études réalisées sur des rongeurs suggéraient qu'une exposition au Bisphénol A pendant le développement à des doses de l'ordre de $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (inférieures à la DJA) entraînait des pubertés précoces et des modifications de la structure histologique de la glande mammaire (33, 29).

Ainsi, une diminution de l'âge de la puberté d'environ 4.5 jours a été observée dans la descendance d'une lignée de souris exposées au BPA à la dose de $2\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{j})$ pendant toute la durée de la gestation et de la lactation (15). L'exposition fœtale de rats femelles au BPA à la dose de $2.5\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{j})$ pendant 13 jours entraîne une altération de l'organisation tissulaire et cellulaire de la glande mammaire (29). L'administration de BPA à la dose de $2.4\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{j})$ pendant 15 jours, à des rats mâles âgés de 21 jours, diminue les concentrations sériques en hormone lutéinisante (LH) et en testostérone. Cet effet n'a pas été retrouvé pour des doses supérieures (100 et $200\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{j})$) (1).

Ces résultats constituent cependant des sujets de controverse pour plusieurs raisons et n'ont donc pas entraîné de modification de la DJA.

- Des scientifiques indépendants n'ont pas réussi à les reproduire.
- Les rongeurs sont très sensibles aux œstrogènes (donc probablement au BPA), ceci pour deux raisons :
 - Les protéines liant spécifiquement les stéroïdes sexuels (SHBG, Sex Hormone-Binding Globulin) sont peu produites par le foie des rongeurs, ce qui peut modifier la pharmacodynamie des œstrogènes.
 - Il existe un cycle entéro-hépatique chez le rat lors de l'élimination du BPA, ce qui pourrait entraîner une exposition interne accrue par rapport à celle de l'homme où ce cycle est absent. Dans ces deux espèces, le principal métabolite du BPA est le BPA-glucuronide (BPA-gluc), qui ne présente pas d'activité œstrogénique. Celui-ci est formé par glucuronidation du BPA dans le foie grâce à l'enzyme UDP glucuronosyltransférase (UGT). Alors que chez l'homme le BPA-gluc est rapidement éliminé dans les urines, chez le rat il est principalement éliminé via la bile dans les fèces et subit un cycle entérohépatique.
- Un autre motif de controverse des résultats est le fait que souvent, un seul niveau de dose est étudié, au lieu de rechercher la relation dose-réponse, essentielle pour l'évaluation du risque. Enfin, l'extrapolation des données toxicologiques de l'animal à l'homme nécessite l'évaluation de l'exposition au BPA, c'est à dire des concentrations plasmatiques en BPA associées aux différents schémas d'administration.

Depuis, beaucoup d'études ont été publiées, aux résultats souvent contradictoires, mais suggérant le danger potentiel du BPA pour de faibles doses (souvent inférieures à la DJA). De nombreux effets délétères ont été mis en évidence comme une baisse de la fertilité du mâle (2, 8, 34, 49), une incidence accrue de cancer du sein (13) et de la prostate. Le BPA interagit aussi avec le traitement du cancer de la prostate (50), accélère la transformation des cellules multipotentes en adipocytes donc favorise l'obésité (39, 27), et par extension l'apparition de diabète. Le BPA augmente aussi l'insulinémie donc favorise le développement d'une insulino-résistance (3). Enfin, des troubles du comportement maternel et augmentation de l'anxiété (33, 50) ont été notés.

I.4.3. Mesures prises par les Etats

Les mesures prises à partir de ces nouvelles données ont été très différentes selon les Etats :

Au Canada, le 18 avril 2008, l'office public de santé du Canada a considéré le bisphénol A comme une substance toxique, et a interdit en mars 2010 l'importation, la vente et la publicité de biberons en polycarbonate au Canada. Il tente aussi de réduire au maximum la quantité de BPA dans les laits en poudre.

En 2008, l'Australie et certains Etats américains (Chicago, Minnesota, Connecticut et Suffolk County) ont suivi cet exemple, et d'autres (Californie, New-York) envisageaient d'interdire son utilisation pour les contenants de boissons. Néanmoins aujourd'hui, les gouvernements reviennent sur leurs décisions, considérant que le Bisphenol A ne présente pas de danger pour la population aux niveaux actuels d'exposition.

En Europe, les conclusions de L'Agence Européenne pour la Sécurité des Aliments (AESA) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) datant de fin 2010 (20) ne remettent pas en cause la DJA actuelle. Malgré cela, la France et le Danemark ont interdit la fabrication et la commercialisation de biberons contenant du BPA. Le Danemark a étendu cette interdiction à tous les contenants destinés à l'alimentation des enfants de 0 à 3 ans (19).

I.5. CONTEXTE DE NOTRE ETUDE

Mon sujet de thèse s'inscrit dans un projet de recherche sur l'impact endocrinien du BPA qui a été financé par l'agence nationale de la recherche (ANR).

Afin d'étudier les effets du BPA sur la fonction de reproduction, nous avons développé le modèle de la brebis prépubère ovariectomisée. Celui-ci nous a permis d'évaluer l'effet du BPA sur la fonction gonadotrope avec différents schémas d'exposition (aiguë, chronique, associé à d'autres composants...) afin de déterminer le mode d'action de cette molécule ainsi que son interaction potentielle avec l'œstradiol.

I.5.1. Présentation du modèle de la brebis prépubère ovariectomisée

Le système générateur de pulses de LH (axe hypothalamo-hypophysaire) de la brebis prépubère est très sensible physiologiquement au rétrocontrôle négatif exercé par les œstrogènes. Ceci explique l'absence de pulses de LH avant la puberté. En ovariectomisant ces animaux, les œstrogènes endogènes ne sont plus sécrétés, ce qui permet le rétablissement les

pulses de LH tout en conservant la grande sensibilité à l'action des œstrogènes. Ainsi, les paramètres des pulses de LH sur la brebis prépubère ovariectomisée représentent un critère objectif, quantitatif et sensible pour caractériser les effets oestrogéniques du Bisphénol A et son impact potentiel sur la fonction de reproduction.

Ce modèle présente plusieurs intérêts majeurs : Tout d'abord, il est précoce. En effet, les études réalisées sur le Bisphénol A évaluent souvent des caractères tardifs comme l'âge de la puberté ou la gamétogenèse. Ces modifications reflètent souvent de façon différée des perturbations précoces de la fonction gonadotrope comme la pulsativité de LH.

De plus, la taille des brebis autorise des prélèvements de sang répétés indispensables à l'étude d'un caractère pulsatile de LH, et l'âge de la puberté de 6 mois permet une étude longitudinale nécessaire pour évaluer la toxicité chronique d'une substance.

I.5.2. Résultats obtenus avec ce modèle

Les résultats présentés dans ce chapitre sont extraits de l'étude de Collet et al. de 2010 (10).

I.5.2.1. Effets d'une exposition aiguë à l'Œstradiol

Une perfusion d'œstradiol permet d'inhiber la sécrétion pulsatile de LH des brebis prépubères ovariectomisées avec un mécanisme dépendant d'une concentration plasmatique seuil (comprise entre 13.5 et 34.3 pg/ml correspondant à une dose administrée comprise entre 0.76 et 3.6µg/(kg.j)). Pour des concentrations en œstradiol supérieures à ce rang de concentration, l'inhibition de LH est rapide (au bout de 20 minutes environ), suggérant un mécanisme d'action non génomique. Pour des concentrations inférieures, il y a une latence de 48h avant l'apparition des effets, suggérant une action génomique de l'œstradiol. La courbe concentration plasmatique - effet en terme d'inhibition de LH pour l'œstradiol dans notre modèle est une sigmoïde. La concentration plasmatique de E2 induisant une efficacité de 50% (EC₅₀) est de 1.9pg/ml et le coefficient de Hill's (pente de la courbe) est de 6,3.

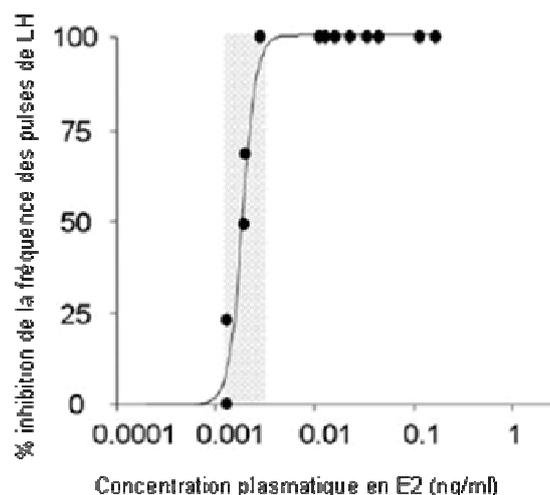


Fig 4. *Inhibition de la fréquence des pulses de LH 48h après le début d'une perfusion d'œstradiol, en fonction de la concentration plasmatique d'œstradiol.*

La courbe est une sigmoïde

E2 exerce donc un effet inhibiteur sur la sécrétion de LH selon une relation linéaire dose-effet pour des concentrations plasmatiques comprises entre 1.3pg/ml et 2.9pg/ml (correspondant à des doses proches de 0.08 et 0.40µg/(kg.j) respectivement). Au dessous de 1.3pg/ml, aucune inhibition de LH n'est observée, et au delà de 2.9pg/ml, l'inhibition est maximale, de 100%.

La clairance de l'œstradiol dans notre modèle a été estimée à 63.5ml/(kg.min).

1.5.2.2. Effets d'une exposition aiguë au BPA

Une perfusion de Bisphénol A, comme l'œstradiol, provoque une inhibition de la sécrétion pulsatile de LH des brebis prépubères ovariectomisées avec un mécanisme dépendant d'une concentration plasmatique seuil (comprise entre 223 et 551ng/ml correspondant à une dose administrée comprise entre 20 et 40mg/(kg.j)). Pour des concentrations en BPA supérieures à celle-ci, l'inhibition de LH est rapide, suggérant un mécanisme d'action non génomique. Pour des concentrations inférieures, il y a une latence de 48h avant l'apparition des effets, suggérant une action génomique du BPA. La courbe concentration plasmatique-effet en termes d'inhibition de LH pour le BPA dans notre modèle n'est pas bien définie, mais pourrait éventuellement être compatible avec une courbe en U.

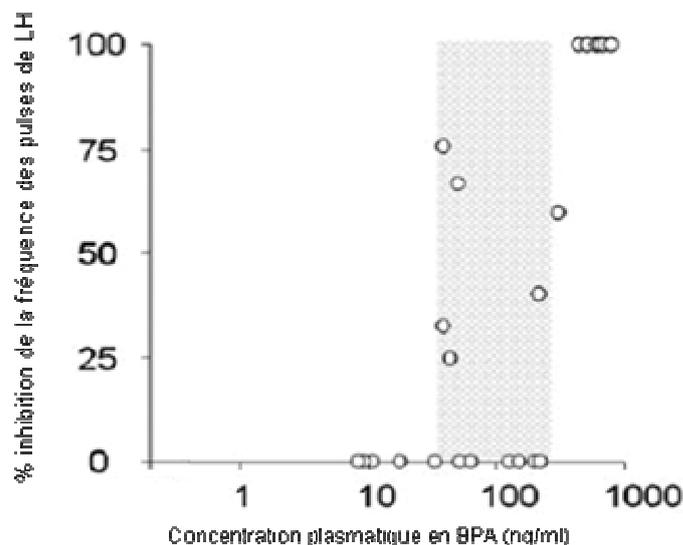


Fig 5. *Inhibition de la fréquence des pulses de LH 48h après le début d'une perfusion de BPA, en fonction de la concentration plasmatique en BPA.*

La courbe concentration-effet pourrait être compatible avec une courbe en U.

Le BPA agit comme l'œstradiol dans notre modèle, mais pour des concentrations environ 10000 fois supérieures, puisque des effets sont détectables lors de concentrations plasmatiques égales ou supérieures à 38ng/ml (correspondant à une dose de 5mg/kg). Ces concentrations sont proches des concentrations sériques observées chez l'homme.

La clairance du BPA dans notre modèle a été estimée à 54.1ml/(kg.min).

I.5.3. Objectifs de l'étude

L'étude ci-dessus, réalisée précédemment au laboratoire, apporte des éléments essentiels pour l'étude des effets de faibles doses de BPA sur l'organisme. Néanmoins, deux éléments n'ont pas pu être pris en compte et restent à explorer pour l'étude du BPA :

- Les effets d'une exposition chronique, reflétant mieux l'exposition humaine. En effet, à travers son alimentation, l'homme va être confronté à des expositions répétées à de faibles doses de BPA. De ces dernières pourraient résulter par exemple, une modification de la réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire (comme une désensibilisation) ou encore une accumulation de BPA dans l'organisme qui pourrait entraîner à long terme des effets délétères avec des doses qui ne présentaient aucun effet lors d'exposition aiguë.
- Les effets combinés de l'œstradiol et du BPA. En effet, une limite de notre modèle d'étude du BPA est la nécessité de supprimer la sécrétion des œstrogènes à l'aide d'une ovariectomie, ce qui empêche d'évaluer la possible synergie entre le BPA et l'œstradiol.

L'inhibition des sécrétions de LH par le BPA, comme celles observées lors d'une exposition aiguë (§ I.5.2), pourrait résulter d'une inhibition de la sécrétion de :

- GnRH au niveau hypothalamique
- LH au niveau de l'hypophyse, en réponse au GnRH

Notre étude avait pour objectifs :

- 1) d'évaluer l'effet d'un traitement à plus long terme au BPA sur le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire et sur les concentrations plasmatiques en BPA chez la brebis prépubère.
- 2) D'analyser les mécanismes d'action du BPA sur la fonction gonadotrope à travers l'étude de la relation dose de GnRH-réponse de l'hypophyse en présence et en l'absence de BPA.
- 3) D'évaluer les effets combinés d'une perfusion simultanée d'E2 et de BPA lors d'un essai pilote.

II. REALISATIONS EXPERIMENTALES

II.1. OBJECTIFS

Les deux expériences avaient pour objectifs :

- Evaluer les effets d'une exposition à long terme au BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Expérience 1)
- Examiner la capacité d'accumulation du Bisphénol A dans l'organisme lors d'administrations répétées (Expérience 1)
- Evaluer les effets du BPA sur la réponse hypophysaire au GnRH (Expériences 1 et 2)
- Déterminer si le BPA et l'œstradiol peuvent agir en synergie sur la sécrétion de LH (Expérience 2)

II.2. ANIMAUX / SYSTEME BIOLOGIQUE

- L'Expérience 1 a été réalisée avec 13 agnelles de race Lacaune, prépubères, âgées de 5.5 mois (moyenne \pm écart type : 5 mois et $17j \pm 4j$) et ovariectomisées entre 9 jours et 107 jours avant le début de l'expérience. Pendant l'expérience 1, les brebis étaient logées dans des boxes collectifs.
- L'Expérience 2 a été réalisée avec 10 agnelles de race Lacaune, prépubères, âgées d'environ 4.5 mois (moyenne \pm écart type : 4 mois et $23j \pm 6j$), ovariectomisées depuis 2 mois. Elles ont été placées dans des boxes individuels 2 jours avant le début de l'expérience.
- Avant les expériences et pendant les 2 semaines séparant les différentes phases du protocole de la deuxième expérience, les agnelles étaient logées dans des boxes collectifs soumis aux variations naturelles de la durée du jour et nourries aux granulés Brebilac® à volonté (environ 700g/jour/animal) sous la forme de deux repas quotidiens avec de la paille et du foin à volonté.
- Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les exigences de la législation française concernant les animaux de laboratoire sous le numéro d'autorisation 31242.

II.3. DEROULEMENT DES EXPERIENCES :

II.3.1. Expérience 1 : Effets d'une exposition chronique au Bisphénol A sur la sécrétion de LH et sur la sensibilité de l'hypophyse au GnRH

Au début de l'expérience, les 13 brebis ont été réparties aléatoirement en 3 groupes :

- Un lot était traité au BPA à la dose de 3.5mg/kg (n=5)

- Un lot était traité avec un œstrogène puissant, le diethylstilbestrol (DES), à la dose de 0.175mg/kg (n=4) (témoin positif)
- Le lot contrôle recevait un volume de 0.14ml/kg de solvant (n=4) (témoin négatif).

Les administrations ont été réalisées par voie intramusculaire deux fois par semaine (alternativement à gauche et à droite), les lundis et vendredis, pendant 8 semaines.

Après la première et la dernière administration, des prélèvements sanguins ont été réalisés sur les animaux traités au BPA avant l'administration (contrôle), puis aux temps 10, 30, 60, 90, 120 min, 4h, 6h, 8h, 10h et 24h après l'administration afin d'évaluer la cinétique de décroissance des concentrations sériques de BPA.

L'expérience s'est déroulée en 2 parties :

Première partie : Evaluation de l'effet d'une exposition chronique à de faibles doses de BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

Avant le début du traitement, des prélèvements de sang ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant 6h afin de s'assurer que les lots étaient équivalents vis-à-vis de la sécrétion de LH.

Une fois par semaine, le mercredi (soit 48h après une administration), durant les 7 premières semaines de traitement, des prélèvements de sang étaient réalisés toutes les 15 minutes pendant 6h afin d'étudier les paramètres de la sécrétion pulsatile de LH. En parallèle, des prélèvements de sang étaient réalisés toutes les heures pour évaluer les concentrations basales de BPA dans le sérum.

Deuxième partie : Effet du traitement Bisphénol A sur la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH.

Durant la 8ème semaine, un essai pilote de stimulation exogène par un analogue de la GnRH, (la Buséreline) a été réalisé sur quatre animaux traités au BPA et sur les animaux recevant du solvant. Chaque animal a reçu aléatoirement par voie intraveineuse une dose de Buséreline (Réceptal®) de 10.5 ou de 31.5ng/kg à l'aide d'un cathéter (Hemocath, Vygon®) placé dans la veine jugulaire droite. Des prélèvements de sang ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant les 45 minutes précédant l'injection et pendant l'heure suivant celle-ci, puis toutes les demi-heures pendant 5h, afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH.

Les sécrétions endogènes de GnRH des animaux avaient été préalablement supprimées par deux administrations intramusculaires de 5µg/kg de benzoate d'œstradiol, respectivement 6 jours et 3 jours avant la stimulation. Cette suppression a été contrôlée après la dernière administration par des prélèvements sanguins sur ces animaux.

Prélèvement de liquide céphalorachidien, euthanasie et autopsie.

A la fin de l'étude, soit 5 jours après le dernier traitement, les animaux du lot traité au BPA et du lot contrôle ont été anesthésiés par injection intraveineuse de Thiopental sodique (Nesdonal®) à la dose de 20mg/kg. Un prélèvement de liquide céphalorachidien a été réalisé par ponction de la cisterna magna à l'aide d'une aiguille à usage unique de 0.5mm de diamètre en vue de quantifier l'accumulation éventuelle de BPA dans le liquide céphalorachidien. Le liquide a été recueilli dans un tube en polypropylène. En parallèle, un prélèvement sanguin a été réalisé afin d'évaluer la concentration sérique de BPA dans les mêmes conditions. Les dosages n'ont pas encore été réalisés à ce jour.

Ensuite, tous les animaux ont été euthanasiés par injection intraveineuse d'une solution de Pentobarbital sodique (Dolethal®). L'autopsie a eu lieu dans les 2 heures suivant cet acte. Les glandes mammaires et l'utérus ont été prélevés (par le même opérateur) et pesés à l'aide d'une balance précise à 1 gramme près. L'hypophyse et le cerveau ont été prélevés et conservés à -20°C pour permettre ultérieurement la quantification du BPA.

La figure 6 résume le protocole utilisé lors de la première expérience.

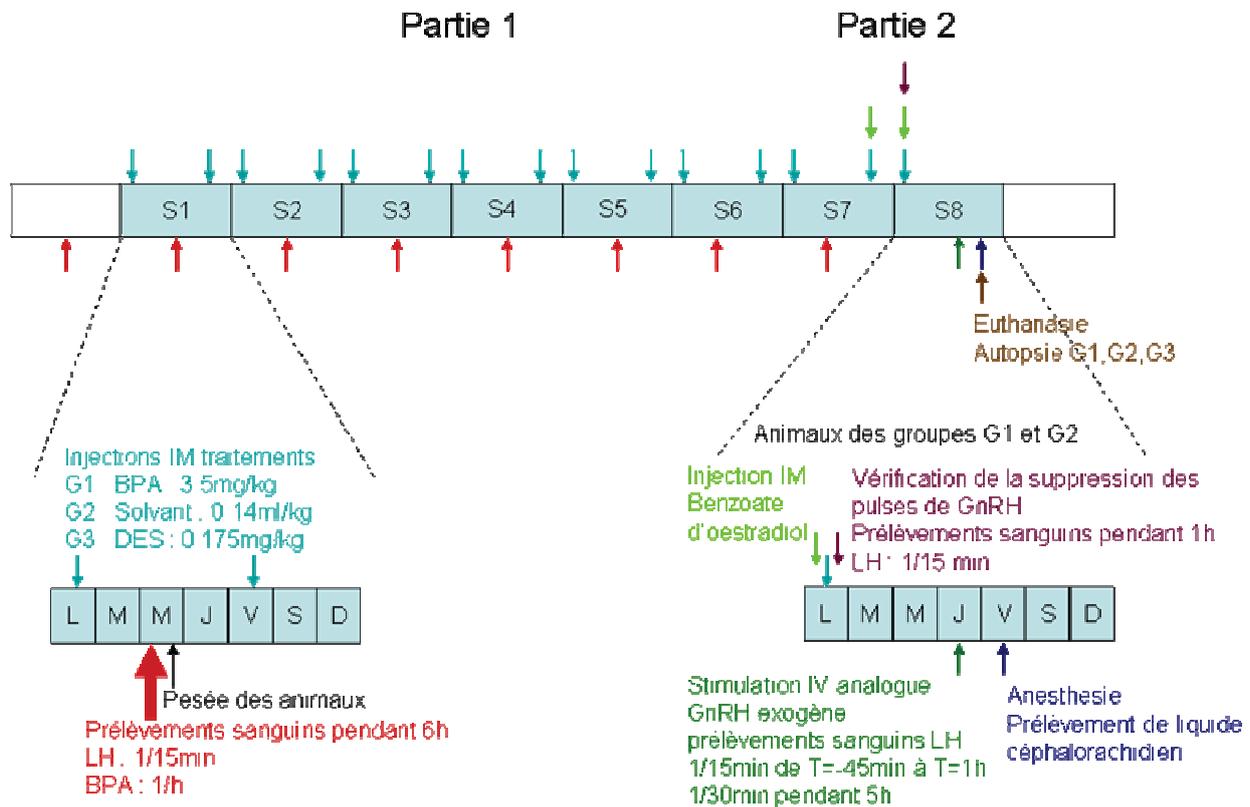


Fig 6. Résumé du protocole de l'expérience 1 visant à évaluer les effets d'administrations répétées de BPA sur la sécrétion de LH.

II.3.2. Expérience 2 : Mécanismes d'action du Bisphénol A sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, et étude d'une possible synergie avec l'œstradiol.

Elle est composée de 2 essais pilotes.

1er essai pilote : Le Bisphénol A agit-il sur la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH ?

Ce test consiste en des stimulations de l'hypophyse de différentes intensités par de la GnRH exogène, sur des animaux traités ou non au Bisphénol A. Une courbe dose de GnRH exogène - réponse de l'hypophyse est ainsi obtenue, en présence et en l'absence de BPA.

Les 8 agnelles de l'expérience ont reçu un implant sous-cutané d'œstradiol (Silastic brand tubing od, 0.46 cm ; id, 0.34 cm, contenant une colonne de 2cm d'œstradiol 17β sous la forme de poudre, Sigma) 10 jours avant le début de l'étude. Cet implant permet d'atteindre des concentrations plasmatiques de l'ordre de 1pg/ml et ainsi de supprimer la sécrétion endogène

de GnRH (donc de LH) sans modifier la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH. Grâce à cet implant, la LH mesurée reflète la réponse de l'hypophyse à la stimulation exogène.

Les 8 agnelles ont ensuite été réparties aléatoirement en deux lots de 4 animaux :

- Un lot a été traité avec une perfusion de BPA à la dose de 5mg/(kg.j) pendant 6 jours (taux de perfusion de 3.4µg/(kg.min)), induisant des concentrations plasmatiques à l'équilibre de l'ordre de 40-50ng/ml. Une étude réalisée précédemment par l'équipe a montré que ces concentrations sont capables d'inhiber la sécrétion pulsatile de LH chez l'agnelle ovariectomisée.
- Un lot est traité avec une perfusion de solvant au même débit pendant 6 jours (lot contrôle).

Aux jours 2, 3, 4 et 5 après le début des perfusions, les brebis ont reçu une administration intraveineuse de GnRH à travers un cathéter (intraflon®). Chaque brebis a reçu les 4 doses de GnRH suivantes : 0.01 ; 0.1 ; 1 et 10µg/kg, selon le plan en cross over équilibré ci-dessous :

Période	1	2	3	4
Agnelle 1	0.01	10	0.1	1
Agnelle 2	10	1	0.01	0.1
Agnelle 3	1	0.1	10	0.01
Agnelle 4	0.1	0.01	1	10

Tableau 2. Plan en cross-over équilibré permettant de répartir les doses de GnRH reçues par les brebis. (0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 µg/kg)

Prélèvements :

- Trois prélèvements sanguins séparés de 15 minutes ont permis d'évaluer la concentration de BPA avant chaque administration de GnRH.
- Après chacune des administrations de GnRH, plusieurs prélèvements ont été réalisés :
 - Prises de sang à T0 (juste avant l'injection de GnRH), T0+2h, T0+4h et T0+6h pour évaluer les concentrations plasmatiques en BPA chez les animaux traités par cette substance.
 - Prises de sang tous les quarts d'heure pendant 2h, puis toutes les demi-heures pendant les 4h suivantes afin de déterminer la concentration en LH

2ème essai pilote : Le Bisphénol A et l'œstradiol agissent-t-il en synergie sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ?

Deux agnelles ont reçu une perfusion simultanée de BPA et d'œstradiol pendant 48 heures.

Les doses administrées étaient de :

- 0.5mg/(kg.j) pour le BPA [taux de 0.34 µg/(kg.min)], ce qui permet d'obtenir une concentration plasmatique à l'équilibre de l'ordre de 5ng/ml.

- 0.03µg/(kg.j) pour l'œstradiol [taux de 0.02 ng/(kg.min)], permettant d'atteindre une concentration plasmatique <1pg/ml à l'équilibre.

Utilisées séparément, ces doses sont trop faibles pour inhiber la sécrétion spontanée de LH. Néanmoins, si ces deux substances agissent en synergie, leur action combinée pourrait avoir des effets sur cette sécrétion.

La veille de la perfusion et à la fin du traitement, des prélèvements de sang ont été réalisés sur chaque brebis toutes les 15 minutes pendant 6h. Ceux-ci ont permis de déterminer les paramètres de la sécrétion de LH lors de ces deux périodes, et ainsi d'évaluer l'impact du traitement sur la fonction gonadotrope.

II.4. MATERIEL ET METHODES

II.4.1. Produits et préparation

Le matériel utilisé pour la préparation et le stockage des produits ne contient pas de Bisphénol A, afin d'empêcher la contamination exogène des solutions injectées.

Toutes les solutions ont été préparées le jour même de l'injection ou du début de perfusion. Elles ont été identifiées, stockées à l'abri de la lumière dans des flacons ambrés à sertir et conservées au réfrigérateur à 4°C.

Les animaux étaient pesés dans la semaine précédant chaque administration afin d'ajuster les traitements au poids de l'animal.

Le BPA utilisé est sous forme de poudre blanche (Sigma-Aldrich®).

Le DES utilisé se présente sous forme de poudre (Sigma-Aldrich®).

L'œstradiol utilisé lors de la première expérience était une solution commerciale de benzoate d'œstradiol (Mesalin®). Lors de la deuxième expérience, du 17-β œstradiol (Sigma®) a été utilisé.

La Busérelina (Réceptal®) était sous forme d'une solution dosée à 1mg/ml.

La GnRH était sous forme de poudre (Bachem), qui a été diluée dans du sérum physiologique contenant 0.1% BSA afin d'obtenir une concentration de 1mg/ml.

II.4.1.1. Préparation des injections intramusculaires (expérience 1)

- Le solvant est constitué d'un mélange éthanol / huile de maïs. (v/v= 1/8).
- Le BPA et le DES ont été dissous aux concentrations respectives de 25mg/ml et de 1.25mg/ml dans ce solvant.

II.4.1.2. Préparation des solutions à perfuser (expérience 2)

- Le volume nécessaire pour toute la durée de la perfusion et pour l'ensemble des groupes a été préparé en une seule fois.
- Le solvant des solutions de BPA et d'E2 est constitué d'un mélange éthanol/propylèneglycol de rapports respectifs v/v=1/49 pour la solution de E2 et 1/4 pour la solution de BPA.

- La solution-mère d'œstradiol, de concentration 200µg/ml, a été préparée en deux étapes. Tout d'abord, 50mg de 17-beta œstradiol ont été dissous dans 25ml d'éthanol dans un flacon ambré à sertir de 50ml pour obtenir une solution à la concentration de 2 mg/ml. Cette solution a ensuite été diluée au 1/10 dans l'éthanol pour obtenir la solution-mère utilisée pour la préparation des solutions à perfuser.

II.4.1.3. Préparation des solutions de GnRH (expérience 2)

- La solution mère de GnRH de 1mg/kg a été diluée dans du sérum physiologique contenant 0.1% BSA. Le volume injecté est toujours de 5ml, ce qui correspond à des solutions de concentrations de 0.08 à 80 µg/ml.

II.4.2. Réalisation des administrations

Toutes les injections intramusculaires ont été réalisées dans les lombes à l'aide d'aiguilles à usage unique de 0.6mm diamètre (Térumo®).

Les injections intraveineuses et les perfusions ont été réalisées via un cathéter relié à un prolongateur (Hémocath®, Vygon, sauf pour les injections de GnRH de l'essai pilote 2 : Intraflon®) inséré dans la veine jugulaire.

Pour les perfusions, le cathéter était placé dans la veine jugulaire gauche, et le prolongateur était branché sur un injecteur portatif (MS32 Sims Graseby). Le débit de perfusion était de 0.2ml/h, comprenant des pulses de 33.3 µl toutes les 10 minutes. Les seringues de perfusion ayant une contenance maximum de 16.5 ml, ont été remplacées toutes les 48h environ, et au moins 12 heures avant une période de prélèvements.

II.4.3. Réalisation des prélèvements

Tous les prélèvements sanguins étaient réalisés dans la jugulaire droite à l'aide d'aiguilles à usage unique de 0.6mm diamètre (Térumo®). Ceux destinés à l'obtention de plasma (étude de la LH, et étude du BPA dans l'expérience 2) étaient recueillis dans des tubes héparinés. Ceux destinés à l'obtention de sérum (étude du BPA dans l'expérience 1) étaient recueillis dans des tubes en verre recouverts de silicone (Térumo®).

II.4.4. Traitements des échantillons et dosages

II.4.4.1. Traitement des échantillons

Les tubes en verre ont été laissés à décanter plusieurs heures à température ambiante, puis ont été centrifugés pendant 30 minutes à 3000g. Le sérum ainsi obtenu a aussitôt été transféré dans des tubes en verre recouverts de silicone (Térumo®).

Dans l'heure suivant le prélèvement, les tubes héparinés ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3000g. Le plasma obtenu a aussitôt été séparé du culot et réparti dans des tubes eppendorf®.

- Lors de l'Expérience 1, l'ensemble du plasma a été transféré dans le même tube eppendorf®.

- Dans l'Expérience 2, le plasma a été réparti de la manière suivante :
 - 250µl pour le dosage de LH
 - 1 fraction de 100µL et 2 fractions de 500µl pour le dosage de BPA

Les prélèvements de liquide céphalorachidien ont été placés dans la glace immédiatement après leur obtention, puis congelés dans la demi-heure suivant le prélèvement.

Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation des dosages.

II.4.4.2. Dosages

LH

Les concentrations plasmatiques de LH ont été évaluées par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) à l'aide du test LH detect® (INRA, Nouzilly). De façon arbitraire, la limite de détection du dosage a été fixée à 0.3ng/ml, soit la moitié de la concentration du premier point de gamme du dosage. Le coefficient de variation intra dosage a été estimé à 11% et le coefficient inter dosage à 12%.

BPA

Les concentrations plasmatiques en BPA ont été évaluées par chromatographie liquide à haute performance, couplée à des ultra-violets (HPLC-UV) et une détection par fluorescence lors de l'Expérience 1, et couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-SM) pour l'Expérience 2. La limite de quantification était de 1ng/ml.

Le dosage du BPA dans le liquide céphalorachidien n'a pas été réalisée.

II.4.5. Analyse des données

L'analyse pharmacocinétique a été réalisée avec le logiciel WinNonlin Professional® (version 5.2).

II.4.5.1. Analyse de la sécrétion pulsatile de LH

Les paramètres que nous avons déterminés sont la fréquence des pulses de LH, l'amplitude de chacun d'eux, et la concentration basale inter-pulse.

Les paramètres moyens de la sécrétion de LH ont été comparés entre les agnelles traitées au BPA et les agnelles contrôles à l'aide d'un test de Student.

Pour la détection des pulses de LH, nous avons adapté la méthode de Wallace et McNeilly (1986). Un épisode sécrétoire est composé de 2 mesures de concentrations de LH consécutives. Il est considéré comme un pulse potentiel si chacune de ces concentrations est supérieure à la moyenne des concentrations des deux échantillons précédents. Pour confirmer ou infirmer la présence d'un pulse, la concentration maximale de l'épisode sécrétoire est comparée à la moyenne des concentrations des 2 épisodes précédents (nadir). Si l'écart entre ces 2 valeurs est supérieur à 3 fois le coefficient de variation intra dosage, l'épisode sécrétoire est considéré comme un pulse.

L'amplitude d'un pulse est définie comme la différence entre la concentration maximale de l'épisode sécrétoire et la concentration basale.

La concentration basale est définie comme la moyenne des nadirs du profil.

II.4.5.2. Analyse de la sécrétion de LH en réponse à une stimulation par de la GnRH exogène

Les paramètres que nous avons déterminés sont :

- L'**AUC** : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de LH durant les 6h suivant l'administration de GnRH. Elle reflète la quantité totale de LH sécrétée. Le calcul des AUC a été réalisé par la méthode des trapèzes linéaires.
- **Cmax** : concentration maximale de LH plasmatique obtenue lors du relargage.
- **Tmax** : temps correspondant au Cmax.

Les paramètres des 2 lots d'agnelles (traitées et non traitées) ont été comparées à l'aide d'une analyse de variance avec le facteur agnelle comme facteur à effet aléatoire, le traitement (BPA vs contrôle), la dose de GnRH, et leurs interactions comme facteurs à effet fixe.

L'effet du traitement a été analysé en utilisant comme terme résiduel la variance du facteur agnelle testée dans le groupe (traité au BPA vs contrôle).

Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Systat® (version 5.2).

II.4.5.3. Analyse de la cinétique de décroissance du BPA après une administration.

Les paramètres que nous avons déterminés sont :

- l'**AUC** : aire sous la courbe des concentrations sériques de BPA pendant les 24h suivant l'administration, reflet de la persistance de celui-ci dans le sang après une administration intramusculaire. L'AUC a été calculée selon la méthode des trapèzes linéaires.
- **Cmax** : concentration sérique maximale.
- **Tmax** : temps correspondant au Cmax.
- La **clairance (Cl)** : rapport entre la dose de BPA administrée et l'AUC des concentrations sériques.

Les paramètres calculés après la première et la dernière injection de Bisphénol A ont été comparés à l'aide d'un test de Student.

II.4.5.4. Analyse du poids de l'utérus et des glandes mammaires après 8 semaines de traitement

L'effet du traitement (BPA, DES ou contrôle) a été déterminé à l'aide d'un test de Student.

III. RESULTATS

III.1. EFFET D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE SUR LA FONCTION GONADOTROPE : EXPERIENCE 1

III.1.1. Résultats

III.1.1.1. Evolution de la pulsativité de LH au cours du traitement

Paramètres de la sécrétion de LH avant le traitement

Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant le début de l'expérience, toutes les 15 minutes pendant 6h, afin de vérifier la pulsativité de LH chez tous les animaux de l'étude. La figure 7 montre le profil obtenu pendant 6h avant le début du traitement chronique pour une brebis représentative.

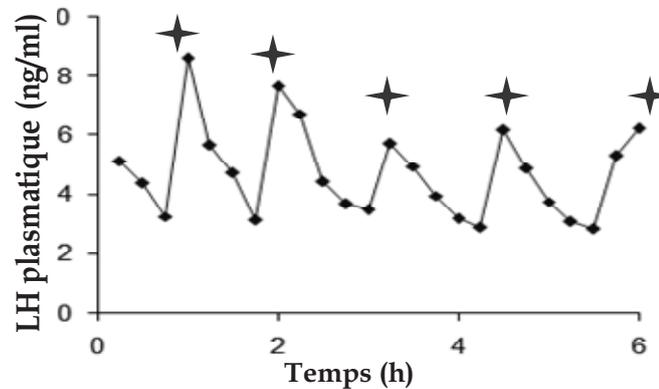


Fig 7. Evolution des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) avant le début des traitements chez une agnelle ovariectomisée représentative

Le signe ★ indique les pulses détectés par la méthode de Wallace et Mac Neilly (1986)

Le Tableau 3 présente les paramètres moyens estimés de la sécrétion de LH pour chaque groupe, ainsi que pour l'ensemble des groupes avant le début des traitements.

	Solvant	BPA	DES	Moyenne
Concentrations basales (ng/ml)	2.42 ± 1.41	1.92 ± 1.10	2.37 ± 1.10	2.24
Amplitude (ng/ml)	2.43 ± 0.85	2.73 ± 0.59	4.98 ± 5.10	3.38
Fréquence (pulses/6h)	4.5 ± 0.58	4.2 ± 0.45	4.75 ± 1.26	4.48

Tableau 3. Paramètres de la sécrétion de LH (moyenne ± ET) pour chaque lot d'animaux avant le début des traitements, et paramètres moyens estimés pour l'ensemble des animaux avant le début des traitements

L'analyse statistique montre que la sécrétion de LH avant le début des traitements n'est pas différente en fonction des groupes d'animaux.

Paramètres de la sécrétion de LH après 6 semaines de traitement

La Fig 8, montre 2 profils caractéristiques obtenus pendant 6h après 6 semaines de traitement (solvant, BPA et DES).

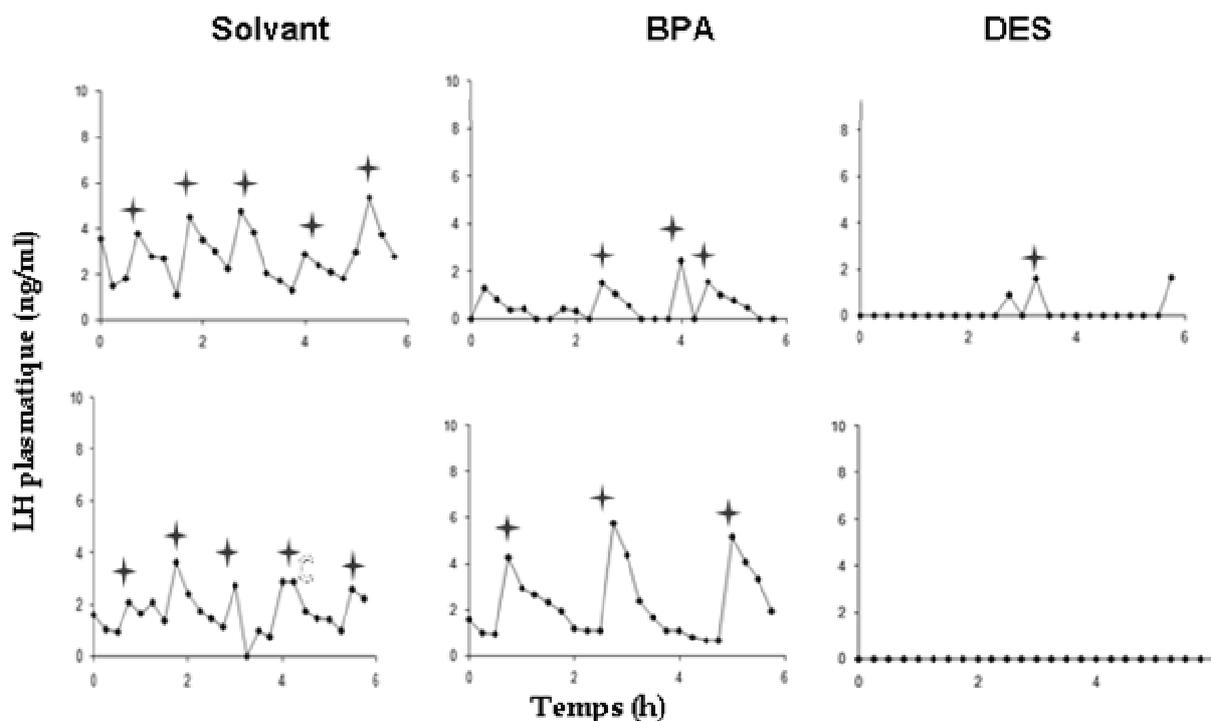


Fig 8. Evolution des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) après 6 semaines de traitement au BPA (3.5mg/kg 2 fois par semaine), DES (0.175mg/kg 2 fois par semaine) ou solvant chez 2 agnelles représentatives par lot.

Le traitement au BPA diminue la concentration inter pulse.

Après 6 semaines de traitement, les brebis qui ont reçu du solvant (contrôle négatif) présentent un profil des concentrations plasmatiques de LH similaire à celui observé avant traitement.

Les brebis traitées au DES (puissant œstrogène) présentent un profil où les sécrétions de LH sont partiellement ou totalement inhibées.

Les brebis traitées au BPA présentent toutes un profil où la pulsativité de LH est conservée. Seules les concentrations basales de LH sont significativement inférieures par rapport à celles du groupe solvant (0.86 vs 1.92ng/ml, P=0,036). La fréquence (3 vs 3.75pulse/6h) et l'amplitude des pulses (3.7 vs 2.78ng/ml) ne varient pas de manière significative.

Le Tableau 4 récapitule les paramètres estimés de la sécrétion de LH pour chaque lot, après 6 semaines de traitement.

	Solvant	BPA	DES
Concentrations basales (ng/ml)	2.24 ± 0.83	0.86 ± 0.51	0.38 ± 0.45
Amplitude (ng/ml)	2.78 ± 1.12	3.7 ± 1.57	0.27 ± 0.34
Fréquence (pulses/6h)	3.75 ± 0.5	3 ± 0	0.75 ± 0.95

Tableau 4. Paramètres de la sécrétion de LH (moyenne ± ET) pour chaque lot d'animaux au bout de 6 semaines de traitement.

Le résultat en gras correspond à un effet significatif du traitement BPA.

Paramètres de la sécrétion de LH après 7 semaines de traitement

Les graphiques de la Fig 9 montrent les profils de sécrétions de LH obtenus après 7 semaines de traitement (solvant, BPA et DES) chez 2 ou 3 agnelles représentatives par lot :

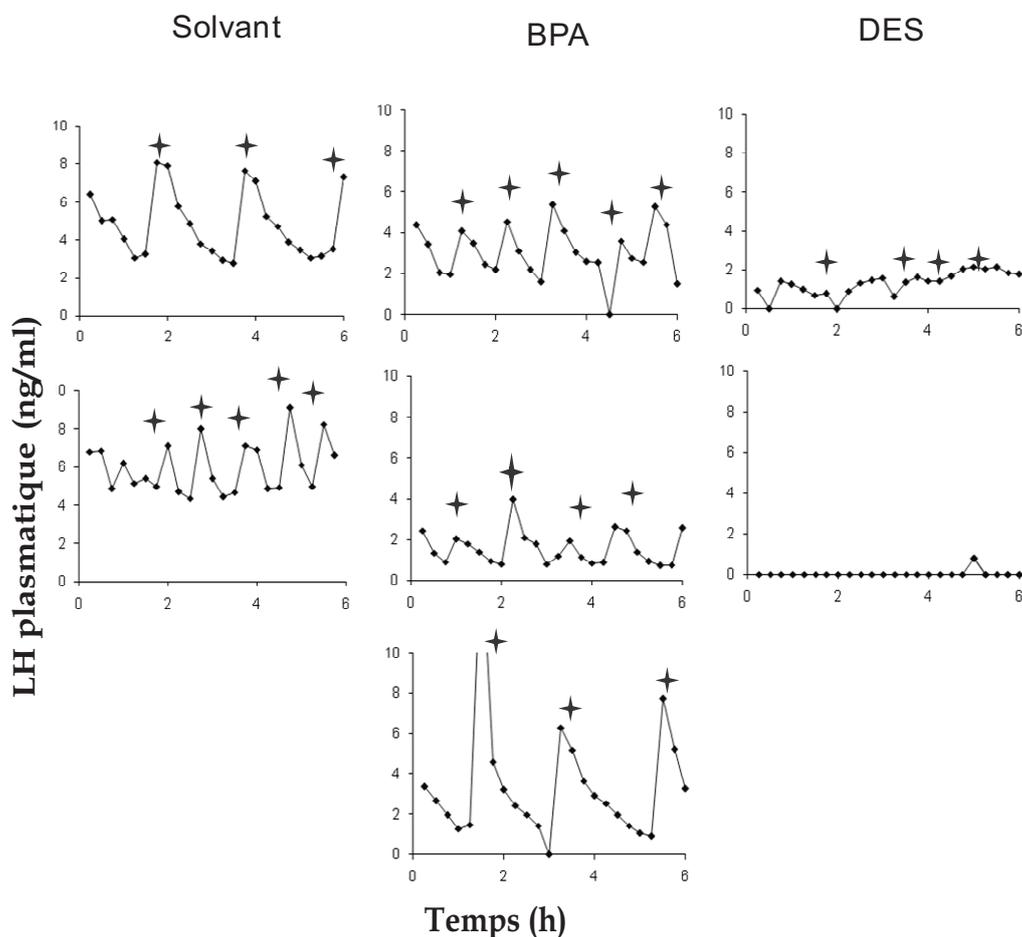


Fig 9. Evolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) après 7 semaines de traitement au BPA (3.5mg/kg, 2 fois par semaine), DES (0.175mg/kg, 2 fois par semaine) ou solvant chez 2 ou 3 agnelles représentatives par lot.

Le traitement au BPA ne modifie pas les paramètres de la sécrétion de LH

Après 7 semaines de traitement, les profils des concentrations plasmatiques de LH des deux groupes contrôles (DES et solvant) sont globalement similaires aux profils observés lors de la 6ème semaine (solvant : profils pulsatiles, et DES : profils de LH totalement ou partiellement inhibés).

Le Tableau 5 donne les paramètres moyens de la sécrétion de LH pour chaque lot, après 7 semaines de traitement :

	Solvant	BPA	DES
Concentrations basales (ng/ml)	3.25 ± 1.5	2.29 ± 1.15	0.41 ± 0.44
Amplitude (ng/ml)	2.97 ± 1.21	3.71 ± 2.79	0.31 ± 0.26
Fréquence (pulses/6h)	4.25 ± 0.96	4.40 ± 1.14	1.75 ± 1.5

Tableau 5. Paramètres de la sécrétion de LH (moyenne ± ET) pour chaque lot d'animaux après 7 semaines de traitement.

Le traitement au BPA ne modifie pas les paramètres de la sécrétion de LH

Après 7 semaines de traitement, aucun effet significatif du traitement au BPA n'a pu être mis en évidence sur la pulsativité de LH. La diminution de concentration basale observée à la 6ème semaine chez les agnelles traitées au BPA n'est pas significative après 7 semaines.

III.1.1.2. Evolution des concentrations sériques de BPA au cours du traitement

Cinétique du BPA après une administration intramusculaire

La Fig 10 illustre l'évolution temporelle des concentrations sériques moyennes de BPA pendant les 24h suivant la première et la dernière administration intramusculaire de BPA à la dose de 3,5mg/kg.

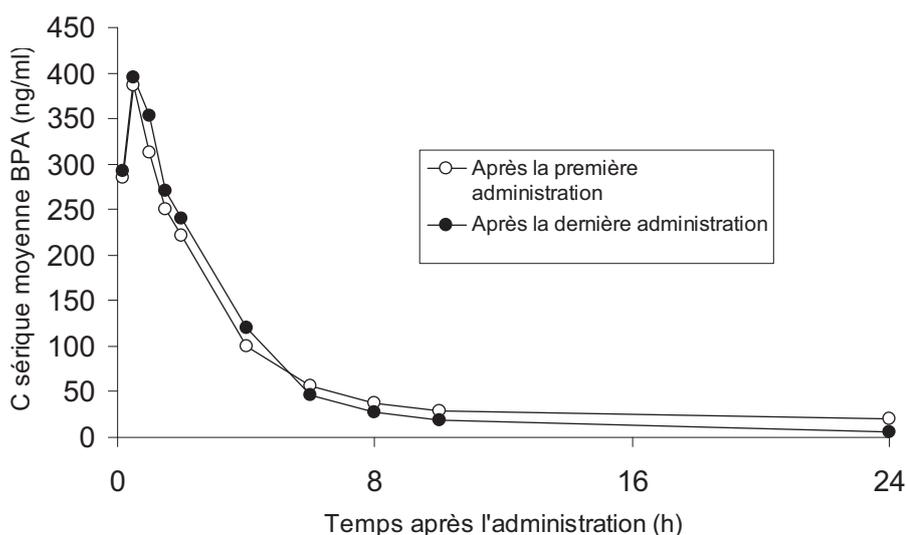


Fig 10. Evolution sur 24h des concentrations sériques en BPA après la première et la dernière administration IM de 3.5 mg/kg de BPA.

Les 2 courbes sont similaires

Les paramètres pharmacocinétiques du Bisphénol A déterminés après la première et la dernière administration de BPA sont récapitulés dans le tableau suivant :

Paramètres (unités)	Après la première administration	Après la dernière administration
AUC _{0-24h} (ng.h/mL)	1502 ± 183	1429 ± 208
C _{max} (ng/mL)	414 ± 182	454 ± 146
T _{max} (h)	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.7
Cl (ml/kg/min)	30.8 ± 13.3	37.1 ± 3.3

Tableau 6. Paramètres pharmacocinétiques du Bisphénol A déterminés après la première et après la dernière administration de BPA.

La répétition des traitements n'a pas modifié les paramètres pharmacocinétiques du BPA.

Après 8 semaines de traitement, il n'y a aucune modification significative des paramètres mesurés : l'élimination du BPA est identique (Cl non modifiée), l'aire sous la courbe des concentrations de BPA n'est pas modifiée (AUC équivalentes), la concentration maximale de BPA (Cmax) et le temps nécessaire à son obtention (Tmax) sont équivalentes.

Concentrations de BPA 48h après une administration IM

Les caractéristiques des concentrations sériques en BPA obtenues lors des prélèvements réalisés chaque mercredi (soit de 48h à 54h après la dernière administration de BPA) sont récapitulées dans le Tableau 7.

	Concentration moyenne (ng/ml)	Ecart type
Semaine 1	<LOQ	0
Semaine 2	1.5	0.8
Semaine 3	1.1	1.8
Semaine 4	1.1	0.6
Semaine 5	1.7	0.6
Semaine 6	1.1	0.2
Semaine 7	<LOQ	0.6
Ensemble	<LOQ	1.0

Tableau 7. Concentrations moyennes de BPA (et écarts types associés) obtenues chaque semaine de l'expérience, 48h après une administration de BPA.

La LOQ est de 1ng/ml.

Chaque semaine, au moment où l'analyse des sécrétions de LH est réalisée, les concentrations de BPA dans le sang de la plupart des agnelles sont inférieures à la limite de détection du dosage ou très faibles, toujours inférieures à 10ng/ml. Aucune modification au cours du temps n'est constatée.

III.1.1.3. Effet des traitements sur les organes reproducteurs

Macroscopiquement, les utérus provenant des brebis des 3 groupes ne semblent pas différents. La Fig 11 montre la photographie d'un utérus prélevé après 8 semaines de traitement au BPA.

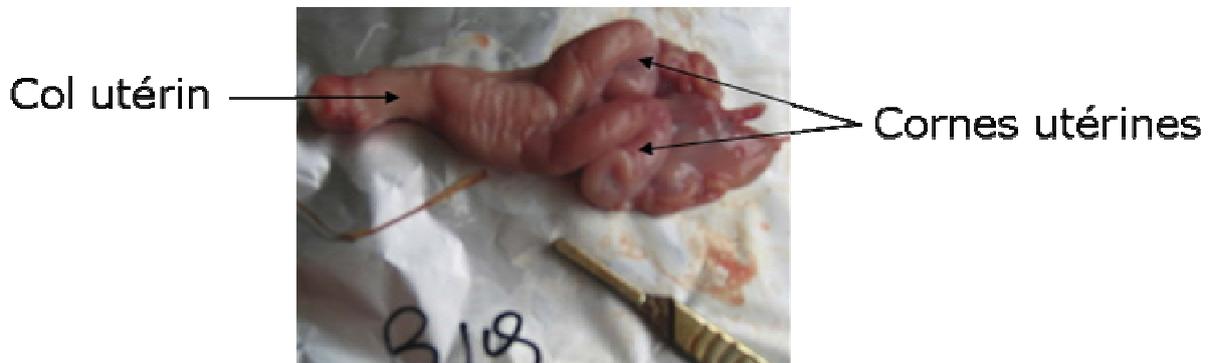


Fig 11. Utérus prélevé sur une brebis traitée au BPA.

La Fig 12 montre l'évolution du poids de l'utérus rapporté au poids de l'animal en fonction du traitement :

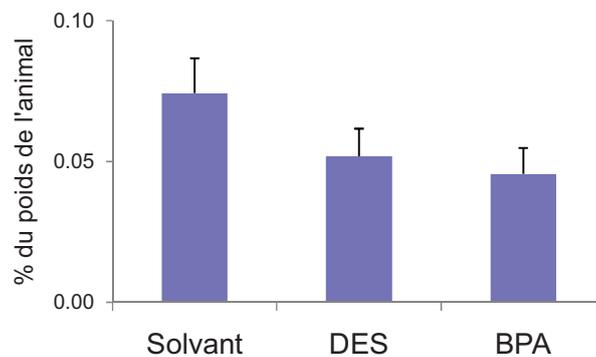


Fig 12. Evolution du poids de l'utérus (en pourcentage du poids de l'animal) \pm écart type selon le traitement (solvant, DES ou BPA).

Le traitement au DES et au BPA a diminué significativement le poids de l'utérus en pourcentage du poids de l'organisme : Le poids moyen de l'utérus des animaux solvant ($0.07 \pm 0.01\%$) est supérieur à celui des animaux traités au BPA et des animaux traités au DES ($0.05 \pm 0.01\%$).

Les glandes mammaires des animaux traités au DES (contrôle positif) sont plus développées que celles des autres animaux.



Fig 13. Mamelle d'un animal traité au DES

Après autopsie, la présence de lait a été mise en évidence dans la mamelle des animaux traités au DES.

La Fig 14 montre l'évolution du poids de la mamelle en pourcentage du poids de l'animal en fonction du traitement :

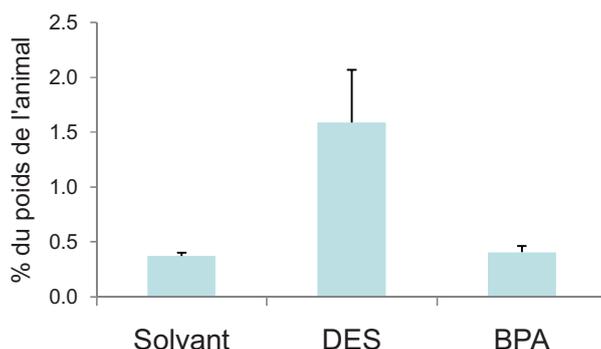


Fig 14. Evolution du poids moyen de la mamelle (en pourcentage du poids de l'animal) \pm écart type selon le traitement (solvant, DES ou BPA).

Le traitement DES augmente de façon importante le poids de la mamelle ($683 \pm 242.22\text{g}$ vs $135.25 \pm 15.09\text{g}$), alors que le traitement BPA n'a pas d'effet significatif sur le poids de la mamelle ($160.6 \pm 12.32\text{g}$ vs $135.25 \pm 15.09\text{g}$).

III.1.2. Discussion

III.1.2.1. Evolution de la pulsativité de LH et des concentrations sériques en BPA au cours du traitement

Nous avons montré qu'au bout de 6 semaines de traitement, le BPA diminue la concentration basale de LH, mais n'a aucune action significative sur la fréquence ou l'amplitude des pulses (Fig 8 et Tableau 4). Cet effet n'a pas été retrouvé à la 7ème semaine de traitement, où aucun effet significatif du BPA n'a pu être mis en évidence (Tableau 5).

Ces résultats suggèrent que le Bisphénol A administré à une dose sans effet lors d'une exposition aiguë (3,5mg/kg 2 fois par semaine, soit 1mg/kg/j) ne modifie pas significativement la sécrétion de LH à long terme. Il ne semble pas y avoir d'effet potentialisateur du traitement.

Nous avons montré que les cinétiques d'élimination du BPA après une administration IM étaient semblables lors de la première administration et après 8 semaines de traitement au BPA (Tableau 6). De plus, quelle que soit la semaine considérée, les concentrations sériques en BPA mesurées 48h après le dernier traitement sont généralement inférieures à la LOQ, et la concentration plasmatique moyenne reste la même d'une semaine à l'autre.

Ces résultats sont en faveur d'une élimination rapide du BPA, comme celle obtenue lors des études après une administration aiguë.

Ils sont aussi en défaveur de l'hypothèse d'une accumulation dans l'organisme puisque 8 semaines de traitement n'ont pas modifié les caractéristiques du profil des concentrations en BPA.

Ces résultats sont en accord avec les différentes études réalisées chez l'homme (47, 46, 44) évaluant la cinétique d'élimination du BPA après une administration aiguë. Le temps de demi-vie estimé est relativement constant, compris entre 4h et 6h, avec une élimination complète obtenue en 24h.

L'absence d'effet du BPA sur la sécrétion pulsatile de LH après 7 semaines de traitement pourrait aussi être dû à l'âge assez avancé de nos agnelles (proches de la puberté) qui provoquerait une baisse de leur sensibilité aux œstrogènes. Cette hypothèse semble renforcée par les résultats obtenus par l'équipe de N.P. Evans (12), qui a réalisé une expérience avec un traitement identique au nôtre (3.5mg/kg 2 fois par semaine) sur des brebis prépubères âgées de 1 mois. Après 5 semaines de traitement, les brebis ont été ovariectomisées, et après 7 semaines de traitement, les paramètres de la pulsatilité de LH ont été évalués. Une baisse de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH a alors été observée, que nous n'avons pas retrouvée lors de notre expérience.

III.1.2.2. Effet des traitements sur les organes reproducteurs

Nous avons montré que le traitement BPA ou DES diminuait le poids de l'utérus (Fig 12). Nous n'avons pas d'explication pour cette observation qui n'est pas cohérente avec les effets classiques des œstrogènes. Après 5 semaines d'un traitement identique au BPA sur des agnelles prépubères non ovariectomisées, Evans et al. avaient noté que le poids de l'utérus était supérieur chez les agnelles traitées au BPA par rapport aux contrôles, sans modification du poids des ovaires (12).

Les œstrogènes favorisent le développement des glandes mammaires, d'où l'augmentation de leur poids (Fig 14) et la présence de lait chez les animaux traités au DES.

III.2. MECANISMES D'ACTION DU BPA SUR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE

III.2.1. Résultats

III.2.1.1. Sensibilité de l'hypophyse à un analogue de la GnRH, la buséréline, au bout de 8 semaines de traitement au BPA (expérience 1)

La Fig 15 montre l'ensemble des profils de sécrétion de LH obtenus lors des 6h suivant l'injection intraveineuse d'un analogue commercial de la GnRH, la Buséréline, aux doses de 10.5 et 31.5ng/kg.

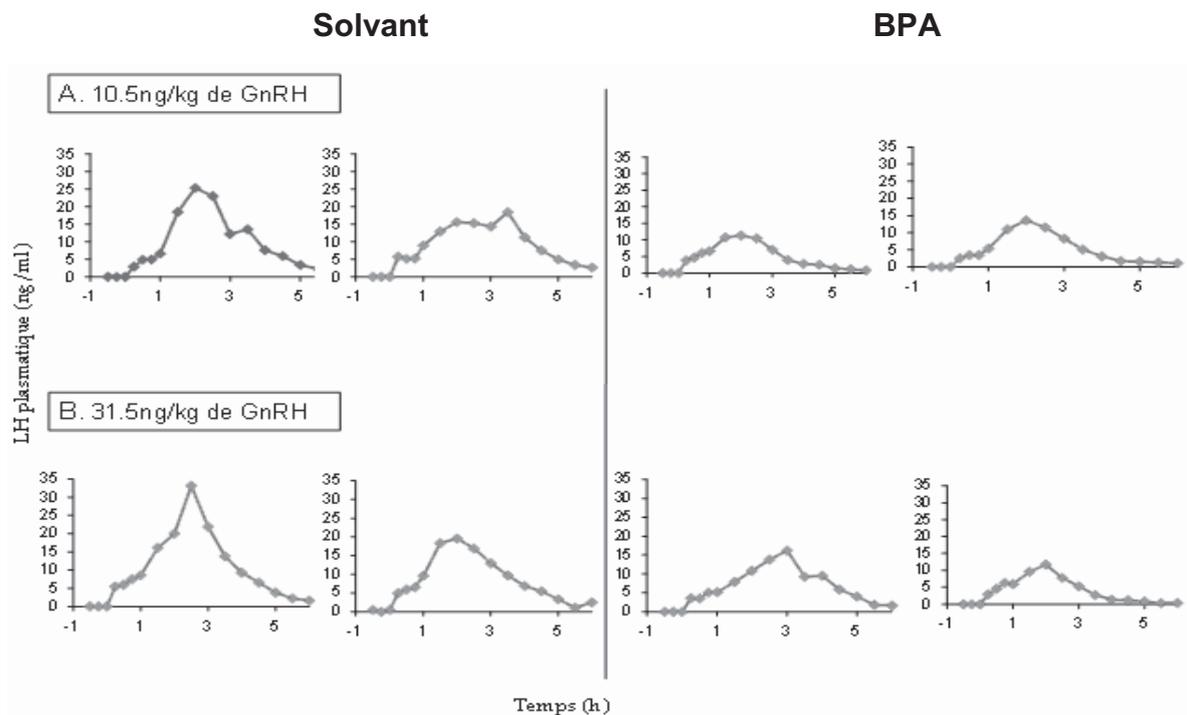


Fig 15. Evolutions des concentrations plasmatiques de LH (ng/ml) pendant 6h après une injection intraveineuse de Buséréline (réceptal®) chez les brebis traitées au BPA (droite) ou au solvant (gauche).

La Fig 15 montre que les concentrations de LH, inhibées préalablement par le traitement au Benzoate d'œstradiol, augmentent après l'administration de Buséréline. Une libération importante de LH est observée chez tous les animaux.

Les paramètres de la sécrétion de LH après une administration de GnRH exogène (Buséréline, Receptal®) par voie intraveineuse aux doses de 10.5 et 31.5ng/kg, obtenus dans les différents groupes, sont présentés dans le tableau suivant :

Traitement	Dose de Buséreléline	AUC(ng.h/mL)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)
Solvant	10.5ng/kg	66.45 ± 6.79	29.22± 5.56	2.25 ± 0.35
	31.5 ng/kg	57.11 ± 2.91	18.97 ± 0.83	2.75 ± 1.06
	Moyenne globale	61.78 ± 6.88	23 ± 6.75	2.5 ± 0.71
BPA	10.5ng/kg	32.08 ± 0.67	12.44 ± 1.64	2 ± 0
	31.5 ng/kg	35.17 ± 13.00	13.94 ± 3.09	2.5 ± 0.71
	Moyenne globale	33.63 ± 5.72	12.5 ± 2.20	2.25 ± 0.5

Tableau 8. Paramètres de la libération de LH (moyenne ± ET) pour les animaux traités au BPA et les animaux contrôles en fonction de la dose de Buséreléline.

Les résultats significatifs sont indiqués en gras

L'analyse statistique ne permet pas de dissocier les brebis du groupe solvant et les brebis du groupe BPA stimulées avec une même dose de Buséreléline (quelle que soit la dose), malgré les fortes différences de réponse obtenues. La faible puissance de notre test statistique lors d'expériences avec un si faible nombre d'animaux (2) explique ce résultat.

De la même façon, l'analyse statistique ne permet pas de dissocier les brebis ayant reçu des doses différentes de Buséreléline à l'intérieur du groupe traité et à l'intérieur du groupe non traité. L'AUC, le Cmax et le Tmax ne sont pas statistiquement différents chez les animaux traités par des doses différentes de Buséreléline. De nouveau, le faible nombre d'animaux (2) explique l'absence de modification significative.

Les groupes ayant reçu des doses de Buséreléline différentes à l'intérieur du groupe BPA et à l'intérieur du groupe solvant étant considérés comme équivalents, nous les avons regroupés afin de comparer les brebis BPA et les brebis solvant, sans tenir compte de la dose de Buséreléline reçue. L'analyse statistique dans ce cas montre que l'AUC de LH obtenue après l'administration de GnRH chez les brebis traitées au BPA est inférieure à celle des témoins (33.63± 5.72ng/ml vs 61.78 ± 6.88ng/ml). De même, le Cmax est plus faible chez les animaux traités au BPA que chez les témoins ($\approx 12.5 \pm 2.20$ ng/ml vs $\approx 23 \pm 6.75$ ng/ml). Par contre, le temps nécessaire à l'obtention de Cmax (Tmax) est similaire, de 2.3h quel que soit le groupe.

III.2.1.2. Stimulation hypophysaire par différentes doses de GnRH

Les Fig 16 et Fig 17 montrent les profils moyens des concentrations de LH obtenues pendant les 6h suivant l'administration de différentes doses de GnRH chez les animaux traités au BPA et les animaux contrôles.

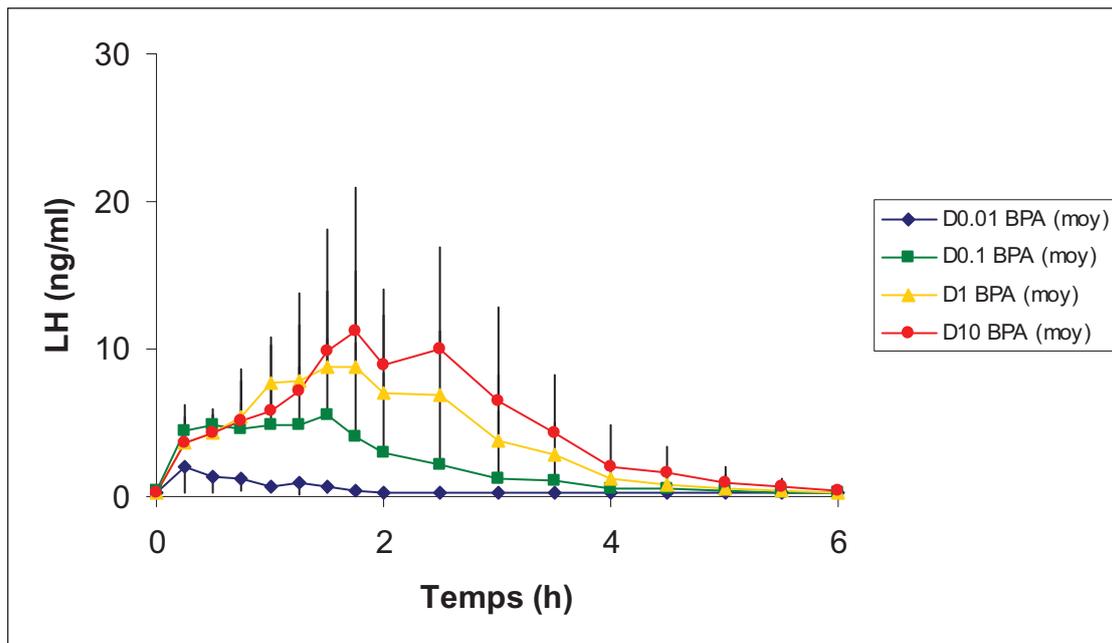


Fig 16. Concentrations plasmatiques moyennes de LH et écart types durant les 6h suivant une administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 ou 10µg/kg des brebis du lot traité au BPA

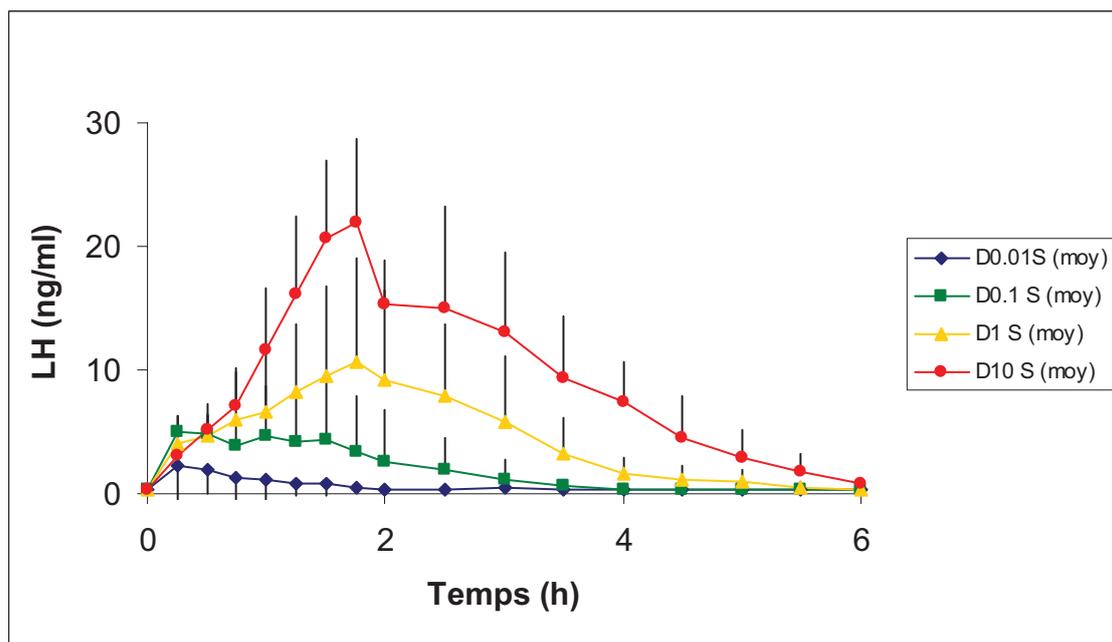


Fig 17. Concentrations plasmatiques moyennes de LH et écart types durant les 6h suivant une administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 ou 10µg/kg pour le lot contrôle

Le Tableau 9 donne les paramètres moyens du profil des concentrations plasmatiques de LH obtenus après les administrations de GnRH à différentes doses.

Dose GnRH (ng/kg)		solvant	BPA
0.01	AUC (0-6h) (h.ng/ml)	3.5 ± 2.5	2.9 ± 1.3
	Cmax (ng/ml)	2.4 ± 2.5	2.1 ± 1.7
	Tmax (h)	0.3 ± 0.14	0.3 ± 0.13
0.1	AUC (0-6h) (h.ng/ml)	11.1 ± 9.7	12.7 ± 15.8
	Cmax (ng/ml)	6.7 ± 3.9	6.8 ± 7.3
	Tmax (h)	0.7 ± 0.31	0.9 ± 0.66
1	AUC (0-6h) (h.ng/ml)	26.6 ± 20.0	22.6 ± 23.3
	Cmax (ng/ml)	11.0 ± 8.2	9.1 ± 9.5
	Tmax (h)	1.7 ± 0.29	1.3 ± 0.43
10	AUC (0-6h) (h.ng/ml)	55.0 ± 18.6	28.1 ± 20.6
	Cmax (ng/ml)	21.9 ± 6.9	11.6 ± 8.9
	Tmax (h)	1.8 ± 0	1.5 ± 0.35

Tableau 9. Récapitulatif des paramètres de la libération de LH (moyenne ± ET) en fonction du traitement (BPA vs contrôle) et de la dose de GnRH.

Les résultats significatifs sont indiqués en gras.

L'AUC, le Cmax et le Tmax moyens augmentent avec la dose de GnRH administrée, dans le groupe traité au BPA et le groupe contrôle

L'AUC des concentrations plasmatiques de LH des agnelles traitées au BPA à la dose de 10ng/kg est significativement inférieure à celle des agnelles contrôles (28.1 ± 20.6 h*ng/ml vs 55.0 ± 18.6 h*ng/ml).

Le Cmax des concentrations plasmatiques de LH des agnelles traitées au BPA à la dose de 10ng/kg est significativement inférieur à celui des agnelles contrôles (11.6 ± 8.9 ng/ml vs 21.9 ± 6.9 ng/ml).

Pour les doses de GnRH inférieures à 10ng/kg, aucune différence significative n'est constatée entre le groupe traité au BPA et le groupe contrôle.

III.2.2. Discussion

Ces tests de stimulation hypophysaire montrent que dans certaines conditions, une stimulation de même intensité par une injection intraveineuse de GnRH ou d'un de ses analogues provoque une libération moins importante de LH chez les animaux traités au BPA que chez les animaux contrôles. Ceci a été montré dans l'Expérience 1 après 8 semaines de traitement bihebdomadaire au BPA (Fig 15 et Tableau 10), et lors d'une stimulation à la dose de 10ng/kg de GnRH intervenant 48h après le début de la perfusion intraveineuse de BPA.

Lors de l'expérience 1, la réponse hypophysaire en terme de sécrétion de LH n'a pas différé pour les 2 doses de Busérelina testées pour la stimulation hypophysaire, ce qui suggère que l'on a obtenu l'effet maximal à partir de la dose de 10,5ng/kg IM. De la même façon, lors de l'essai pilote 1, seule la plus forte dose de GnRH (10ng/kg) a permis de mettre en évidence un

effet significatif du BPA sur la réponse de l'hypophyse au GnRH. Ces résultats suggèrent que l'action du BPA sur l'hypophyse consiste à diminuer sa réponse maximale au GnRH.

Deux hypothèses peuvent alors être envisagées pour expliquer la réponse maximale moins importante de l'hypophyse en présence de BPA sur le long terme :

- Le moindre degré de réponse de l'hypophyse résulte d'une baisse dans le nombre de récepteurs membranaires au GnRH
- La plus forte dose de GnRH induit la libération de la totalité des réserves hypophysaires en LH. La diminution de la réponse à cette dose de GnRH pourrait traduire une baisse du stock hypophysaire de LH chez les animaux traités au BPA. Cette hypothèse semble plus pertinente, puisqu'une stimulation moins importante ne provoquerait pas un relargage total de la LH donc n'engendrerait pas de modification de la réponse de l'hypophyse lors d'exposition au BPA.

Les résultats obtenus nous permettent aussi de conclure qu'il est peu probable que l'inhibition de la sécrétion pulsatile de LH qui avait été observée précédemment lors d'exposition aiguë au BPA (collet et al. (10), cf paragraphe I.5.2) résulte d'une action de ce dernier sur l'hypophyse, mais plutôt d'une action sur l'hypothalamus. En effet, nous avons montré que lors de stimulation de faible intensité de l'hypophyse par le GnRH, qui est représentative de la stimulation physiologique de l'hypophyse par le GnRH, l'exposition au BPA n'induisait pas de modification dans la sécrétion de LH. Pourtant une même dose de BPA agissant sur l'ensemble de l'axe hypothalamo-hypophysaire provoque une diminution de l'intensité et de la fréquence des pulses de LH. De plus, physiologiquement, la fréquence des pulses de LH est contrôlée par la fréquence des pulses de GnRH sécrétés par l'hypothalamus (un pulse de GnRH provoque un pulse de LH). Une modification de cette fréquence est donc en faveur d'une action sur l'hypothalamus.

Nous avons montré que la seule action du BPA à la dose testée sur l'hypophyse dans notre modèle est de diminuer sa réponse maximale à l'action du GnRH, probablement en diminuant ses réserves en LH. De plus, l'action globale du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (donc lors de stimulation physiologique de l'hypophyse), provoque une modification de la fréquence des pulses de LH. Ceci suggère que le BPA présente une action inhibitrice sur l'hypothalamus, engendrant une diminution de la quantité et de la fréquence de la sécrétion de GnRH par celui-ci, et que c'est ce mécanisme qui induit l'inhibition observée dans la sécrétion de LH.

Pour approfondir ces mécanismes, il serait intéressant d'étudier les effets de différentes expositions au BPA sur les caractéristiques de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus.

III.3. ETUDE D'UNE POSSIBLE SYNERGIE DU BPA ET DE L'ŒSTRADIOL SUR LA SÉCRETION DE LH (ESSAI PILOTE 2)

III.3.1. Résultats

Des prélèvements ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant 6h avant le début du traitement et après 48h de perfusion, afin d'évaluer les effets de celui-ci sur la sécrétion de LH.

La Fig 18 montre les profils de sécrétion de LH obtenus lors de ces prélèvements. Les étoiles représentent les pics détectés de LH.

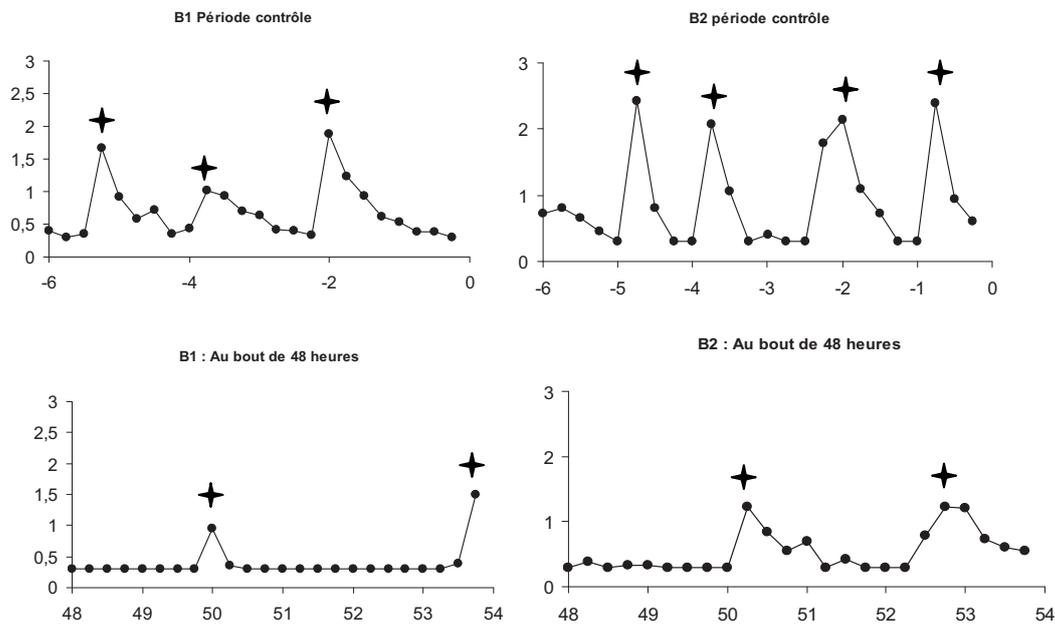


Fig 18. Concentrations plasmatiques de LH durant 6h avant et près 48h de perfusion simultanée de BPA et de E2 aux taux de 0.34 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ et 0.02 $\text{ng}/(\text{kg}\cdot\text{min})$

Le Tableau 10 compare les caractéristiques de la sécrétion pulsatile de LH avant et après 48h de perfusion.

		Contrôles		Pendant la perfusion	
		Moyenne	ET	Moyenne	ET
Contrôles	LH basale (ng/ml)	0.34	0.03	0.30	0.00
	Amplitude (ng/ml)	1.55	0.55	0.93	0.00
	Pulse/6h	3.50	0.71	2.00	0.00

Tableau 10. Récapitulatif des paramètres de la libération de LH (moyenne \pm ET) avant et après 48h de perfusion aux taux de 0.34 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ de BPA et 0.02 $\text{ng}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ de E2.

Les résultats significatifs sont indiqués en gras

Une perfusion de 48h comprenant du BPA à la dose de 0.5 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{j})$ et de l'œstradiol à la dose de 0.03 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{j})$ permet d'inhiber significativement la sécrétion de LH. Cette inhibition concerne aussi bien la concentration basale (0.30 ng/ml vs 0.34 \pm 0.03 ng/ml) que l'amplitude des pulses (0.93 ng/ml vs 1.55 \pm 0.55 ng/ml) et leur fréquence (2 pulses/h vs 3.5 \pm 0.71).

III.3.2. Discussion

Nous avons montré qu'une perfusion de BPA et d'œstradiol à des doses respectives n'entraînant pas de modification de la sécrétion pulsatile de LH pendant 48h était capable

d'inhiber significativement celle-ci, aussi bien en terme de fréquence, d'amplitude maximale que de concentration basale.

Ce résultat suggère l'existence d'une synergie d'action entre l'œstradiol et le BPA.

Ceci pose le problème de la pertinence de la DJA actuelle, obtenue à partir d'expériences ne tenant pas compte de l'effet potentialisateur des œstrogènes sur l'action du BPA. En effet, une dose reconnue comme sans effet par les études « classiques » pourrait se révéler néfaste une fois combinée à l'action naturelle des œstrogènes de l'organisme.

Les études menées précédemment ont permis de montrer qu'une dose de 0.5mg/(kg.j) de BPA dans notre modèle engendrait une concentration plasmatique de 9.5ng/ml (10) soit une dose fréquemment rapportée dans les études épidémiologiques humaines (les taux moyens dans la population varient entre 2 et 4ng/ml). Nous avons donc montré que dans notre modèle de brebis prépubère ovariectomisée, en présence de concentrations physiologiques d'œstrogènes, le BPA présentait une action sur l'axe hypothalamo-hypophysaire à des concentrations de même ordre de grandeur que celles présentes chez l'humain.

Malgré la forte sensibilité de notre modèle vis-à-vis des œstrogènes, ce résultat suggère que le BPA pourrait présenter une action sur les populations des pays. Néanmoins, lors d'expériences réalisées par la suite au laboratoire, l'action simultanée d'E2 et de BPA n'a pas pu être reproduite. Il est donc nécessaire de valider notre résultat sur un plus grand nombre d'animaux.

Il est donc important d'étudier les effets du BPA sur des modèles plus physiologiques, dont la sécrétion d'œstrogènes n'a pas été supprimée afin d'étudier l'action combinée de ces deux substances.

IV. CONCLUSION

Le Bisphénol A est un xénobiotique œstrogène-mimétique issu de la plasturgie. A ce titre, il est capable d'interférer avec la fonction de reproduction.

Celle-ci étant régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire, nous nous sommes intéressés à l'action du Bisphénol A sur la sécrétion d'une gonadotrophine, la LH, par l'hypophyse. Le modèle utilisé était celui de la brebis ovariectomisée, très sensible à l'action inhibitrice des œstrogènes sur cet axe.

Plusieurs objectifs étaient fixés :

- Evaluer les effets à long terme du BPA à travers une exposition de 8 semaines à une dose de 3.5mg/kg deux fois par semaine (dose inférieure à la DJA et n'induisant pas d'effets sur la sécrétion de LH lors d'exposition aiguë)
Cette étude a permis de montrer que le BPA n'avait pas de répercussion significative sur la sécrétion de LH à long terme, et que le BPA ne semblait pas s'accumuler dans l'organisme.
- Etudier l'effet du BPA sur la sensibilité de l'hypophyse à l'action du GnRH ou d'un analogue de celui-ci
Les résultats obtenus montrent que l'action du BPA sur la réponse hypophysaire au GnRH est limitée à la diminution de sa réponse maximale, mais est sans effet lors de stimulations avec des doses plus « physiologiques ». Pour inhiber la sécrétion de LH, le BPA agirait donc principalement sur l'hypothalamus, en perturbant la sécrétion de GnRH.
- Examiner une potentielle action synergique entre le BPA et les œstrogènes naturels sur la sécrétion de LH, à l'aide d'une perfusion simultanée d'œstradiol et de BPA à doses n'induisant aucune modification sur la sécrétion de LH quand elles sont utilisées seules. Ceci revient à évaluer l'action du BPA sur un modèle « plus physiologique », en présence d'œstrogènes.
Cette étude suggère la présence d'une action synergique de l'E2 et du BPA, induisant des effets sur la sécrétion de LH pour des concentrations plasmatiques de BPA du même ordre de grandeur que celles observées lors des études épidémiologiques chez l'homme.

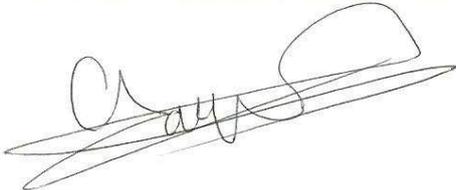
En bilan, nous avons montré qu'une exposition chronique au BPA (engendrant des concentrations sériques supérieures à celles représentatives de l'exposition humaine), ne permet pas d'observer d'effets sur la sécrétion de LH sur notre modèle dont la sécrétion d'œstrogènes a été supprimée. Par contre, il est impératif d'évaluer les effets combinés du BPA et des œstrogènes présents à des doses physiologiques.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

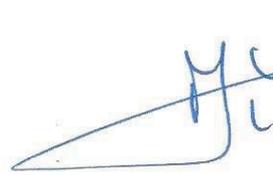
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, *Véronique GAYRARD*, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *Anne-Sophie LEVRET-CORJON* intitulée « *Mécanisme d'action du bisphénol A sur la fonction gonadotrope chez la brebis prépubère ~~du bisphénol A~~* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 05/09/2011
Professeur *Véronique GAYRARD*
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



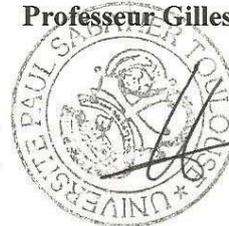
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON




Vu :
Le Président du jury :
Professeur *Jean PARINAUD*



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier 21 SEP. 2011
Professeur Gilles FOURTANIER

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

V. BIBLIOGRAPHIE

1. **Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP** 2004 Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen Bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat leydig cells. *Endocrinology* 145(2):592-603
2. **Al-Hiyasat AS, Darmani H, Elbetieha AM** 2002 Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *European Journal of Oral Sciences Sci.* 110:163–167.
3. **Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A** 2006 The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives* 114: 106-112.
4. **Baratta M, West LA, Turzillo AM, Nett TM** 2001 Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. *Biology of Reproduction.* 64(2):714-9.
5. **Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL** 2005 Urinary concentrations of bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives* 113:391-395
6. **Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D** 2010 Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *Journal of Endocrinology* 207:127–134
7. **Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE** 1992 Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BRITISH MEDICAL JOURNAL* 305:609-613
8. **Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP** 2003 Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185:119–127.
9. **Chun TY, Gorski J** 2000 High concentrations of Bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line *Toxicology and applied Pharamcology* 162: 161-165
10. **Collet SH, Picard-Hagen N, Viguié C, Lacroix MZ, Toutain PL, Gayrard V.** 2010 Estrogenicity of bisphenol a: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicological Sciences* 117(1):54-62.
11. **Dodds EC, Lawson W** 1936 Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996
12. **Evans NP, North T, Sandra D, Sweeney T** 2004 Differential effects of the endocrine-disrupting compounds Bisphenol-A and Octyphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domestic Animal Endocrinology* 26:61-73
13. **Fernandez SV, Russo J** 2010 Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicologic Pathology* 38(1): 110–122
14. **Garcia-Gasca A, Spyropoulos DD** 2000 Differential mammary morphogenesis along the anteroposterior axis in Hoxc6 gene targeted mice. *developmental dynamics* 219:261–276
15. **Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, Vom Saal FS** 1999 Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401:763-764
16. <http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol>
17. http://fr.wikipedia.org/wiki/Recepteur_des_oestrogenes

18. <http://www.bisphenol-a.org>
19. <http://www.bisphenol-a-europe.org/index.php?page=legislation>
20. <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/cef100930.htm>
21. **J. Alejandro Arreguin-Arevalo and Terry M. Nett** 2005 A Nongenomic Action of 17 β -Estradiol as the Mechanism Underlying the Acute Suppression of Secretion of Luteinizing Hormone. *Biology of Reproduction* 73:115-122
22. **J. Alejandro Arreguin-Arevalo and Terry M. Nett** 2006 A Nongenomic Action of Estradiol as the Mechanism Underlying the Acute Suppression of Secretion of Luteinizing Hormone in ovariectomized ewes. *Biology of Reproduction* 74:202-208
23. **Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ** 2009 Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 26(6):928-37.
24. **Kuiper GJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J** 1996 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138(3):863-870
25. **Kurosawa T, Hiroi H, Tsutsumi O, Ishikawa T, Osuga Y, Fujiwara T, Inoue S, Muramatsu M, Momoeda M, Taketani Y.** 2002 The Activity of Bisphenol A Depends on Both the Estrogen Receptor Subtype and the Cell Type. *Endocrine Journal* 49(4):465-471
26. **Hiyama M, Choi EK, Wakitani S, Tachibana T, Khan H, Kuakabe KT, Kiso Y** 2011 Bisphenol A affects reproductive formation across generations in mice *The Journal of Veterinary Medical Science*, mai 2011
27. **Masuno H, Kidani T, Sekiya K, et al** 2002 Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *Journal of Lipid Research* 43: 676-684.
28. **Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T** 2000 Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances : a species comparison *Journal of Steroid and molecular biology* 74:223-224
29. **Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM** 2007 Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma *in situ* following fetal bisphenol A exposure. *Reproductive Toxicology* 23:383-390
30. **Nett TM, Crowder ME, Wise ME** 1984 Role of estradiol in inducing an ovulatory-like surge of luteinizing hormone in sheep. *Biology of Reproduction*. 30(5):1208-15.
31. **Olsen CM, Meussen-Elholm ETM, Samuelson M, Holme JA, Hongslo JK** 2003 Effects of the environmental oestrogens Bisphenol A, Tetrachlorobisphenol A, Tetrabromobisphenol A, 4-Hydroxybiphenyl and 4,4'-Dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacology and Toxicology* 92:180-188
32. **Palanza P, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS** 2002 Exposure to a Low Dose of Bisphenol A during Fetal Life or in Adulthood Alters Maternal Behavior in Mice. *Environmental Health Perspectives* 110 (3):415-422
33. **Ryan CB, Vandenberg JG** 2006 Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Hormones and Behavior* 50:85-93
34. **Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, Kurosawa S, Kurohmaru M, Hayashi Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C** 2001 Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of Occupational health* 43:185-190.
35. **Schönfelder G, Witthoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Choud** 2002 Parent Bisphenol A accumulation in the human-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives* 110(11):703-707

36. **Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with food** 2006 Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with food on a request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxydiphenyl)propane (Bisphenol A). *The EFSA Journal* 428:1-75
37. **Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W** 2004 Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology*. Dec 1;205(1-2):103-12.
38. **Singleton DW, Feng Y, Yang J, Puga A, Lee AV, Khan SA** 2006 Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells. *Environmental Research* 100(1):86-92.
39. **Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, et al** 2009 Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 117: 1549-1555.
40. **Takeuchi T, Tsutsumi O** 2002 Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibility linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Communications* 291:76-78
41. **Thomas P, Dong J** 2006 Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102(1-5):175-9.
42. **KESSLER Thomas, David** 2001 Thèse vétérinaire Alfort: Perspectives d'utilisation des administrations chroniques d'agonistes et d'antagonistes de la GnRH en médecine vétérinaire
43. **Tinwell H, Haseman J, Lefevre PA, Wallis N, Ashby J** 2002 Normal sexual development of two strains of rat exposed *in Utero* to low doses of Bisphenol A. *Toxicological Sciences* 68:339-348
44. **Tsukioka T, Terasawa J, Sato S, Hatayama Y, Makino T, Nakazawa H** 2003. Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *Analytical Sciences* 19(1):151-3.
45. **Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV** 2007 Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24:139-177
46. **Völkel W, Bittner N, Dekant W** 2005. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 33(11):1748–1757
47. **Völkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W** 2002 Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical Researches in Toxicology* 15(10):1281–1287.
48. **Vom Saal FS, Hughes C** 2005 An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 113(8):926-933
49. **Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV** 1998 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. *Toxicology and Industrial Health* 14:239–260.
50. **Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE** 2002 The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 1:515–524
51. **Wetherill YB, Akingbemi BT, Kannod J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM** 2007 In vitro molecular mechanisms of bisphenol A. *Action Reproductive Toxicology* 24:178–198