

28

Effets chromosomique, génétique et épigénétique

Chaque individu présente les caractères de l'espèce avec des variations qui lui sont propres, résultant de l'expression de son programme génétique et de l'influence environnementale. Les caractères héréditaires, spécifiques de l'espèce, sont transmis par les parents, de génération en génération. Ces caractères héréditaires sont déterminés par un ensemble d'informations contenues dans les chromosomes, supports du programme génétique (génom). Le support des gènes est constitué par la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) formé de deux brins complémentaires. La division cellulaire (mitose) assure le transfert de l'information génétique d'une cellule mère aux cellules filles. Seules les cellules précurseurs des cellules sexuelles subissent une division spéciale nommée méiose qui permet le brassage allélique de l'information génétique.

Plus récemment, on a observé que l'expression des gènes est régulée dans le temps et l'espace. L'épigénétique correspond à « l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence ADN ». Elle regroupe donc un ensemble de facteurs qui modifient l'action des gènes de manière transmissible pour des cellules, des tissus, voire parfois, pour des individus qui peuvent transmettre ces modifications à leur descendance.

De nombreuses observations suggèrent que les expositions environnementales (en particulier durant la gestation), peuvent induire des modifications génétiques ou épigénétiques qui pourront être transmises aux générations suivantes et/ou conduire à des maladies qui se manifesteront plus tard au cours de l'existence.

Effets méiotiques

La méiose est initiée par des cassures double-brins dont la réparation par recombinaison homologue en méiose I va créer les forces nécessaires à la ségrégation des chromosomes, en vue de la réduction haploïde des gamètes matures en méiose II. Ce processus peut être perturbé par l'induction ectopique de cassures double-brins, résultant par exemple d'irradiations, et par

toute anomalie génétique ou épigénétique perturbant l'appariement, la recombinaison et la ségrégation des chromosomes homologues.

Les erreurs méiotiques peuvent engendrer une gamme d'effets adverses sur la fertilité : une stérilité complète, des conditions de sub-fertilité, ou la formation de gamètes aneuploïdes susceptibles d'entraîner des avortements spontanés et des phénotypes pathologiques chez la descendance. Pour rappel, il existe un dimorphisme sexuel dans la cinétique méiotique chez les mammifères. Chez la plupart des espèces, les échanges chromosomiques sont en effet initiés en période prénatale chez la femelle et la ségrégation chromosomique s'achève à chaque cycle folliculaire. Chez le mâle, la méiose se déroule pour la première fois à la puberté et sera répétée tout au long de la vie à chaque cycle spermatogénétique. Enfin, il est aussi pertinent de souligner ici que mâles et femelles ne répondent pas de façon identique à des perturbations méiotiques, en raison de l'existence du corpuscule sexuel chez le mâle (résultant de l'appariement partiel des chromosomes X et Y), qui impose des contrôles plus stringents du déroulement de la méiose (Hunt et Hassold, 2002). Des invalidations génétiques chez la souris ont ainsi montré que les cellules germinales mâles sont beaucoup plus sensibles, et toute mutation de gènes méiotiques engendre en général une azoospermie complète. Chez les femelles, pour des mutations identiques, la gamétogenèse n'est pas perturbée en soi, mais les gamètes produits ont une constitution chromosomique anormale.

Configuration chromosomique

Les études pionnières du groupe de T. Hassold et P. Hunt ont pour la première fois révélé un effet potentiel du BPA sur la méiose, et en particulier sur la méiose femelle dans le modèle murin (Hunt et coll., 2003). Les premières observations sont liées à une exposition accidentelle au BPA de colonies de souris, résultant de l'endommagement des containers d'eau secondaire à l'utilisation par inadvertance de détergents alcalins pour le nettoyage. Les auteurs ont ainsi rapporté une augmentation drastique du nombre d'alignements chromosomiques anormaux en métaphase I (de 40 % à 1 ou 2 % en situation non exposée) et de cas d'aneuploïdies par non-disjonction chromosomique en métaphase II (de 6 % à 0,7 % en situation non exposée). Le taux d'exposition entraînant ces effets a été estimé par chromatographie de masse à 14-72 µg/kg de masse corporelle par jour. Le protocole expérimental contrôlé a ensuite consisté en une exposition journalière dans l'eau de boisson à 20, 40 et 100 µg/kg de BPA, sur des souris juvéniles de 20 à 22 jours post-partum, pendant 6-8 jours, avant analyse de la configuration chromosomique en métaphase II (ovocytes ovulés). L'étude montre alors un effet dose et durée dépendant de l'exposition au BPA sur l'incidence de figures anormales d'alignement chromosomique, avec une culminance de 10 % à 100 µg/kg pendant 7 jours. Ainsi, l'exposition à faible dose de BPA en phase finale de la méiose, après la naissance, semble induire une augmentation significative d'anomalies d'alignement des chromosomes méiotiques, avec un effet potentiel sur la ploïdie

des ovocytes en fin de méiose, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. En effet, les études *in vivo* ne permettent pas de distinguer des effets directs sur l'ovocyte des effets indirects sur les cellules de la granulosa (follicule) ou liés à une perturbation de l'axe neuro-endocrinien.

En 2005, Can et coll. utilisent un modèle de maturation ovocytaire (ovocyte et son follicule) *in vitro* pour tester les effets du BPA à forte dose (10 à 30 mM). Des effets sur la cinétique de progression de la méiose sont observés, en l'absence d'effet sur l'axe neuro-endocrinien, avec perturbation du centrosome et du réseau de microtubules, conduisant à la formation de fuseaux méiotiques anormaux en métaphase I. En 2008, Lenie et coll. reproduisent le même type de protocole expérimental avec les mêmes doses de BPA et montrent que les capacités stéroïdiennes des cellules de la granulosa ne sont pas altérées par le BPA, et que l'effet sur la méiose serait ainsi direct. Ils observent de plus à forte dose de BPA (30 μ M) un taux important de défauts d'alignement chromosomique et de déformations du fuseau méiotique en métaphase I, avec un nombre conséquent d'ovocytes arrêtés. Seulement 50 % des ovocytes exposés passent en fait la métaphase I et atteignent le stade de métaphase II, qui est normale. À faible dose, les ovocytes passent sans encombre la métaphase I, progressent en métaphase II mais présentent des anomalies d'alignement chromosomique à ce stade, sans aneuploïdie cependant.

Une étude récente a été menée chez la souris (C57BL/6J) pour étudier l'effet du BPA sur la prophase I méiotique des cellules germinales au cours de la différenciation de l'ovaire fœtal (Lawson et coll., 2011). Les mères ont reçu une dose journalière de 20 ng de BPA par gramme de poids à partir du 11^e jour de gestation. Des analyses transcriptomiques ont été réalisées à 12, 12,5, 13,5 et 14,5 jours de gestation. Elles révèlent que l'expression des gènes de méiose est altérée, la plupart étant surexprimés. De plus, quatre gènes surexprimés à 14,5 jours sont impliqués dans la régulation du cytosquelette. Les auteurs font l'hypothèse de deux mécanismes d'action du BPA dans l'ovaire fœtal, l'un ayant pour effet de désorganiser le cytosquelette ce qui empêche les mouvements des chromosomes lors de l'initiation de la méiose, le second entraînant une sous expression des gènes impliqués dans les cycles mitotiques. Le BPA causerait une entrée prématurée en méiose et un manque de prolifération de la population des cellules germinales. De cette façon, le BPA entraînerait une réduction du pool des ovocytes fœtaux et une augmentation du risque de produire des ovocytes et des embryons aneuploïdes

Aneuploïdie

Dans leurs observations initiales, Hunt et coll. (2003) avaient rapporté non seulement des anomalies d'alignement chromosomiques, mais également une augmentation de l'incidence d'aneuploïdies en métaphase II, résultant potentiellement de problèmes de ségrégation chromosomique. Cependant, Eichenlaub-Ritter et coll. revoient cette conclusion en 2008 en utilisant un

protocole d'exposition sub-chronique postnatale, avec une administration à faible dose de BPA par voie orale pendant 7 jours, suivie de la maturation *in vitro* d'ovocytes dénudés en absence de BPA. Ils ne retrouvent pas de cas d'hyperploïdies, bien que des problèmes d'alignement en métaphase I soient observés. Dans une étude parallèle, les mêmes auteurs procèdent cette fois avec une étude purement *in vivo* d'exposition à faible dose de BPA, dans des conditions similaires à l'étude originale de Hunt et coll. (Pacchierotti et coll., 2008). Ils n'observent pas d'anomalies du nombre de chromosomes, ni dans les ovocytes en métaphase II, ni dans les zygotes fécondés. Les auteurs concluent que l'exposition au BPA affecte bien l'alignement des chromosomes en métaphase I, mais n'augmente pas le risque d'erreurs en nombre de chromosomes, du fait de l'élimination potentielle en amont des ovocytes anormaux.

Cette même étude inclut également l'analyse de la méiose mâle après exposition postnatale au BPA, à diverses doses pendant 6 jours. Aucun effet sur la cinétique méiotique n'est observé, et il n'existe pas non plus d'augmentation du nombre d'aneuploïdies dans les spermatozoïdes matures analysés 22 jours après cette exposition (en respectant donc la chronologie de progression spermatogénétique de l'entrée en méiose à la production de spermatozoïdes épидидymaires). Il s'agit de la seule étude répertoriée d'analyse des conséquences d'exposition au BPA sur la méiose mâle. Bennetts et coll. (2008) ont plus particulièrement étudié les effets du BPA sur des spermatozoïdes humains purifiés, après exposition *in vitro*. Avec ce protocole simplifié, le BPA s'avère inactif dans l'induction de stress oxydatif, la perturbation du mouvement flagellaire, et l'induction de cassures ADN, alors que d'autres composés œstrogéniques sont positifs sur ces paramètres. Dans cette même perspective, une autre tentative d'étude de la capacité du BPA à induire des cassures ADN a été réalisée *in vitro*, sur des cellules de cancer du sein exprimant le récepteur aux œstrogènes (MCF-7) (Iso et coll., 2006). À forte dose, le BPA a des effets génotoxiques sur ces cellules, mais une concentration 1 000 fois supérieure à celle de l'œstrogène E2 est nécessaire pour induire un nombre de cassures similaire.

En résumé, une réponse dose dépendante sur l'organisation des chromosomes en métaphase de méiose I est systématiquement retrouvée dans toutes les études. Cependant, le BPA n'augmenterait pas l'incidence de production d'ovocytes aneuploïdes, du fait du maintien normal de la ségrégation des chromosomes et/ou d'un arrêt précoce des ovocytes trop anormaux. Le phénotype d'aneuploïdie à faible dose de BPA initialement reporté par Hunt et coll., pourrait provenir d'effets synergiques d'exposition non contrôlée à d'autres agents. En effet, la composition en phyto-œstrogènes de l'alimentation semble influencer le taux d'aneuploïdie (Muhlhauser et coll., 2009).

Effets épigénétiques

La régulation épigénétique participe au programme développemental et cellulaire normal. Ainsi, l'engagement vers un programme particulier est initié par divers stimuli, le plus souvent sous forme de signaux tels qu'une molécule développementale, une hormone, un changement de température, l'application de forces physiques... Cette perception de l'environnement extérieur est traduite au sein de la cellule par des voies de signalisation intracellulaires, qui aboutissent dans le noyau à l'activation ou la répression de gènes cibles, par la liaison de facteurs de transcription. Cette réponse transcriptionnelle est ensuite consolidée par des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications vont assurer la stabilité de la décision cellulaire en l'absence du signal inducteur d'origine, mais également la perpétuation de cette identité aux cellules filles issues de la cellule d'origine qui a été confrontée au signal inducteur. Sans ce verrou final, les décisions développementales seraient labiles et la constitution de tissus homogènes impossibles.

Des anomalies épigénétiques peuvent être la cause ou la conséquence d'une altération d'un programme développemental donné. Un mode d'action épigénétique est suspecté lorsque des perturbations précoces en vie foetale ou néonatale induisent un phénotype adulte, et/ou induisent des effets multigénérationnels voire transgénérationnels. Ce dernier cas de transmission implique une altération de la lignée germinale. Tout programme de différenciation normal s'accompagne de profils épigénétiques spécifiques et il est notamment bien documenté que les cellules germinales subissent des remaniements importants de leurs profils de méthylation en période foetale normale, en relation avec le programme de différenciation gonadique et sexuel. Ces cellules ont la particularité d'effacer leurs profils épigénétiques en préparation de l'acquisition de marques spécifiques à la lignée germinale et au sexe de l'individu (Trasler, 2006). Une exposition précoce à des perturbateurs endocriniens est donc susceptible d'altérer les profils transcriptionnels et épigénétiques des organes cibles des androgènes et œstrogènes, et aussi directement ou indirectement la programmation épigénétique de la lignée germinale.

Effets précoces du BPA sur la méthylation de l'ADN à l'âge adulte

La prise de conscience d'un effet potentiel du bisphénol A sur les profils de méthylation de l'ADN provient d'une étude menée en 2007 par Dolinoy et coll. Les auteurs utilisent dans cette étude une lignée de souris porteuse d'un allèle métastable du gène *agouti* contrôlant la couleur du pelage, c'est-à-dire dont le statut de méthylation variable peut être aisément suivi par la couleur du pelage. Des femelles exposées à un régime fortement supplémenté en bisphénol A (50 000 µg/kg/jour) pendant deux semaines avant accouplement et tout au long de la période de gestation et de lactation ont une reproduction normale et une progéniture saine, mais cette dernière présente un excès de

couleur jaune de pelage qui signe une surexpression du gène *agouti*. Une hypométhylation du locus est en effet retrouvée, ainsi qu'au niveau d'un autre locus métastable. Cette étude suggérait qu'une exposition prénatale et continue au BPA, au moins à forte dose, pouvait modifier les phénotypes adultes par altération de l'épigénome.

Les effets du BPA en exposition foetale et/ou néonatale sur la méthylation de l'ADN de tissus somatiques adultes ont été proposés par d'autres études, en utilisant des doses faibles. Tout d'abord, Ho et coll. (2006) rapportent une perte de méthylation au locus *Pde4d4* dans la prostate de rats exposés à 10 µg/kg de BPA à la naissance, en association avec une prédisposition au développement d'hyperplasies prostatiques. Les variations de méthylation reportées sont cependant peu significatives et leur impact *in vivo* sur la transcription de ce gène n'a pas été étudié. De même, Yaoi et coll. (2008) documentent des hypo- et des hyperméthylations à divers loci dans le cerveau antérieur d'embryons à jours 12,5 et 14,5 de gestation, après que leurs mères aient été injectées à partir du jour 0 de gestation avec 20 µg/kg/jour de BPA. Des variations d'expression semblent exister aux loci concernés, mais les différences de méthylation sont peu significatives par rapport à des embryons témoins. Enfin, plus récemment, des souris femelles exposées *in utero* par injection maternelle de 5 µg/kg de BPA du jour 9 au jour 16 de gestation ont montré un défaut important de méthylation du gène *Hoxa10* dans l'utérus à l'âge adulte (Bromer et coll., 2010). De plus, cette hypométhylation conduit à une sensibilité accrue aux œstrogènes et une expression augmentée de *Hoxa10*.

Bien que les profils de méthylation n'aient pas été analysés, un nombre d'études rapportent des changements d'expression de gènes clés dans des tissus adultes consécutifs à une exposition foetale ou néonatale au BPA, qui pourraient signer une programmation épigénétique précoce de phénotypes adultes (Monje et coll. 2007 ; Salian et coll., 2009a ; 2009b). Bien qu'associées à des phénotypes spermatogénétiques et reproducteurs importants chez les mâles (voir plus loin) (Salian et coll., 2009b et c), les deux études menées dans le laboratoire de T. Vanage sont en revanche difficilement concluantes quant à des perturbations d'expression éventuelles. En effet, ces études sont basées sur une analyse immunohistochimique de l'expression de marqueurs clés tels que des protéines de jonction des cellules de Sertoli ou encore de coactivateurs de récepteurs stéroïdiens. Cette approche ne permet pas une estimation quantitative précise et les conclusions quant à ce point sont sujettes à caution. Enfin, il est intéressant de souligner un autre mode potentiel d'altération épigénétique de processus développementaux précoces par le BPA, via les microARNs. À l'issue d'une étude réalisée à l'échelle du génome global, le microARN mir436, reconnu pour ses effets sur la prolifération cellulaire, a été trouvé surexprimé dans deux lignées humaines placentaires différentes exposées à 25 µg/ml pendant 6 jours (Avisar-Whiting et coll., 2010).

Effets multigénérationnels et transgénérationnels d'exposition précoce au BPA

Une transmission multigénérationnelle de phénotypes délétères s'applique aux cas où la génération F1 exposée en période périnatale ainsi que la génération F2 issue de la lignée germinale F1 exposée sont touchées. Des effets transgénérationnels sont évidents à partir de la génération F3, qui n'a été exposée ni au niveau somatique ni au niveau germinale. Cette transmission de phénotype sous-tend une imprégnation irréversible du matériel germinale, dont les effets ségrégent selon des paramètres mendéliens. Si l'absence de mutation génétique est formellement prouvée, il s'agit dans ce cas d'effets épigénétiques transgénérationnels, ou en d'autres termes de transmission de caractères acquis.

En utilisant le modèle rat, Salian et coll. (2009a, b, c) ont rapporté un effet sur la fertilité mâle après exposition néonatale à des doses faibles de BPA du jour 0 au jour 5 ou après exposition périnatale par gavage des mères de jour 12 de gestation à jour 21 après la naissance. Dans ces protocoles, les individus mâles F1 exposés, mais également les animaux F2 et F3 présentent une baisse de la fertilité, associée à une réduction du nombre et de la motilité de leurs spermatozoïdes et une augmentation du nombre d'avortements induits après croisements avec des femelles témoins. De façon notoire, les effets ne s'estompent absolument pas au cours des générations. Les conclusions de cette étude s'opposent donc à l'absence d'effets multigénérationnels et transgénérationnels précédemment publiée par Ema et coll. (2001) et Tyl et coll. (2002).

En conclusion, il existerait un effet direct dose-dépendant d'exposition au BPA sur la première division méiotique. Cet effet de dose ne s'applique cependant pas en seconde division méiotique, puisque la concentration la plus faible (3 nM) induit la plus forte incidence en anomalies de métaphase II. La variation dans les protocoles d'exposition, les différences en fond génétique des souris et de régime alimentaire rendent difficile une interprétation définitive sur l'effet d'une exposition au BPA à faible dose en période postnatale sur la méiose femelle. Chez le mâle adulte, l'exposition au BPA pendant 6 jours après la naissance n'affecte pas le processus méiotique, ni la ségrégation des chromosomes méiotiques. Le BPA n'a pas d'effet *in vitro* sur les spermatozoïdes matures. Aucune étude n'a cependant été conduite concernant des effets sur la méiose après exposition en période fœtale, ni chez la femelle, ni chez le mâle.

Des effets transgénérationnels du BPA à faible dose pourraient exister, suite à une exposition en seconde moitié du développement fœtal et/ou pendant la période de lactation. Le maintien du phénotype en F3 implique un marquage de la lignée germinale. En l'absence d'investigation du mécanisme moléculaire sous-jacent, il n'est pas possible de conclure entre, d'une part, l'induction par le BPA d'une mutation génétique dans la lignée germinale des individus F1 et donc d'un effet génotoxique ou, d'autre part, une altération des profils

épigénétiques ou épimutation, qui serait transmissible et échapperait alors à la vague de reprogrammation épigénétique que connaît normalement la lignée germinale.

BIBLIOGRAPHIE

AVISSAR-WHITING M, VEIGA K, UHL K, MACCANI M, GAGNE L, et coll. Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod Toxicol* 2010, Apr 24. [Epub ahead of print]

BENNETTS LE, DE IULIIS GN, NIXON B, KIME M, ZELSKI K, et coll. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa : evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat Res* 2008, **641** : 1-11

BROMER JG, SAKKAS D, SIANO LJ, BENADIVA , PATRIZIO P. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J* 2010, Feb 24

CAN A, SEMIZ O, CINAR O. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod* 2005, **11** : 389-396

DOLINOY DC, HUANG D, JIRTLE RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104** : 13056-13061

EICHENLAUB-RITTER U, VOGT E, CUKURCAM S, SUN F, PACCHIEROTTI F, PARRY J. Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutat Res* 2008, **651** : 82-92

EMA M, FUJII S, FURUKAWA M, KIGUCHI M, IKKA T, HARAZONO A. Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2001, **15** : 505-523

HO SM, TANG WY, BELMONTE DE FRAUSTO J, PRINS GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 2006, **66** : 5624-5632

HUNT P, HASSOLD T. Sex matters in meiosis. *Science* 2002, **296** : 2181-2183

HUNT PA, KOEHLER KE, SUSIARJO M, HODGESCA, ILAGAN A, et coll. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 2003, **13** : 546-553

ISO T, WATANABE T, IWAMOTO T, SHIMAMOTO A, FURUICHI Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull* 2006, **29** : 206-10

LAWSON C, GIESKE M, MURDOCH B, YE P, LI Y, HASSOLD T, HUNT PA. Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A. *Biol Reprod* 2011, **84** : 79-86

LENIE S, CORTVRINDT R, EICHENLAUB-RITTER U, SMITZ J. Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutat Res* 2008, **651** : 71-81

MONJE L, VARAYOUD J, LUQUE EH, RAMOS JG. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol* 2007, **194** : 201-212

MUHLHAUSER A, SUSIARJO M, RUBIO C, GRISWOLD J, GORENCE G, et coll. Bisphenol A effects on the growing mouse oocyte are influenced by diet. *Biol Reprod* 2009, **80** : 1066-1071

PACCHIEROTTI F, RANALDI R, EICHENLAUB-RITTER U, ATTIA S, ADLER ID. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. *Mutat Res* 2008, **651** : 64-70

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sci* 2009a, **85** : 11-18

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 2009b, **265** : 56-67

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci* 2009c, **85** : 742-752

TRASLER JM. Gamete imprinting : setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev* 2006, **18** : 63-69

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZAR, et coll. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146

YAOI T, ITOH K, NAKAMURA K, OGI H, FUJIWARA Y, FUSHIKI S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **376** : 563-567