

# 31

## Autres modèles d'études

La plupart des travaux menés jusqu'à aujourd'hui abordent les effets du bisphénol A (BPA) comme étant des effets essentiellement de type œstrogénique. Bien que de tels effets aient été démontrés *in vitro*, leur démonstration *in vivo* reste peu probante et l'utilisation de modèles génétiquement modifiés propose également d'autres modes d'action possible.

### Modèles génétiquement modifiés, études *in vitro*

#### Chez les mammifères

L'utilisation de modèles génétiquement modifiés pour détecter une activité œstrogénique en réponse au BPA est encore peu développée au niveau des tissus suspectés d'être de potentielles cibles de ce perturbateur (ovaire, utérus, prostate...). Quelques études ont utilisé des souris ER-luciférase et les résultats apparaissent variables (tableau 31.I) et peu probants. Pourtant, de nombreux effets du BPA ont été rapportés chez l'adulte et chez le fœtus notamment à des doses faibles (allant jusqu'à 0,25 µg/kg/j). Cette discordance dans les observations pourrait provenir de la multiplicité des doses et des voies d'administration utilisées. Notons également que peu de travaux (voire aucun) ont utilisé des mutants pour les récepteurs nucléaires *in vivo*, ou sur culture d'organes pour tester les effets du BPA. Que les effets développementaux du BPA soient dus à une activité œstrogénique reste donc à établir.

Une approche intéressante et alternative est la transfection de constructions ERE-luciférase dans des cellules *in vitro*. Une illustration de cette approche est la transfection de cellules de Leydig fœtales par une construction ERE-luc qui a permis de démontrer l'activité œstrogénique du BPA *in vitro* dans ces cellules.

Enfin, sur une lignée de souris mutante pour l'aromatase, l'enzyme permettant la production d'œstrogène, souris ArKO, un traitement au BPA permet de restaurer les fonctions ovariennes et utérines (Toda et coll., 2002). Ce travail démontre bien une activité de type œstrogénique du BPA.

**Tableau 31.1 : Effet du BPA dans divers modèles *in vivo***

Références	Dose (µg/kg)	Voie d'administration	Modèle	Observations
Lemmen et coll., 2004a et 2004b	1 000	Ip	Souris hétérozygote ER-luc	Induction de l'activité luciférase après 8 h, cependant plus d'effet visible après 24 h d'exposition à 10 000 µg/kg
Laws et coll., 2000	200 000	Sc et Vo	Rats Long-Evans ovariectomisés	Augmentation du poids de l'utérus chez les rats pré-pubères (test utéro-trophique)
Tinwell et coll., 2002	50 000	Vo	Rats Alderley Park	Augmentation de l'âge de l'ouverture vaginale après exposition pendant la gestation
Tyl et coll., 2002	500 000	Exposition alimentaire	Rats Sprague-Dawley	Pas d'effet sur le poids utérin, mais altération du nombre d'implantations et de la taille des portées (exposition sur trois générations)
Honma et coll., 2002	20	Sc et Vo	Souris ICR (CD-1)	Les descendants présentent une ouverture vaginale précoce après exposition pendant la gestation
Tinwell, et coll., 2000	300 000	Sc et Vo	Souris AP	Pas d'effet œstrogénique dans le test utéro-trophique chez des souris immatures après trois jours d'exposition
Takagi et coll., 2004	env 150 000	3 000 ppm dans la nourriture	Rats Sprague-Dawley	Pas d'effet sur l'ouverture vaginale ou la cyclicité œstrienne après une exposition périnatale (exposition alimentaire des mères)
Markey et coll., 2001	25-250	Pompe osmotique maternelle	Souris CD-1	Augmentation du nombre de structures terminales épithéliales dans la glande mammaire après une exposition pendant la gestation
Ter Veld et coll., 2009	50 000	Vo	Souris gestante ER-luc	Pas d'augmentation significative de l'activité luciférase dans les tissus maternels et fœtaux, faible diminution de l'activité dans le placenta

Ip : intra-péritonéal ; Vo : voie orale

## Chez les poissons téléostéens et les amphibiens

Des lignées transgéniques de poissons ont également été utilisées. Dans une première approche une construction de type ERE-tk-Luc a été introduite chez le zebrafish et l'exposition aux œstrogènes pendant la phase larvaire a montré une activation significative (200 fois à 1 microM sur des larves âgées de 35 jours). Un seuil de détection à 1 nM d'œstradiol a été observé (Legler et coll., 2000). Sur une lignée indépendante de zebrafish où un ERE a été placé en amont du promoteur de la vitellogénine et du gène de la GFP (ERE-zvtg1-GFP) une induction de l'expression de la GFP à une concentration de 0,01 µg/l d'éthinylœstradiol a été observée. L'ajout de BPA à une concentration de 1 000 µg/l a également été noté après 13 jours d'exposition, ce qui montre que

le BPA est faiblement œstrogénique *in vivo* chez le poisson-zèbre (Chen et coll., 2010). La même dose de 1 000 µg/l induit l'expression de la GFP après 21 jours d'exposition dans une lignée mvtg1-GFP ou le promoteur du gène de la vitellogénine 1 de médaka a été fusionné à la GFP (Zeng et coll., 2005).

L'ensemble de ces données encore fragmentaires confirme la faible œstrogénicité du BPA *in vivo* puisque ce composé est 10 000 fois moins puissant que le ligand naturel *in vivo* (Chen et coll., 2010 ; Zeng et coll., 2010). Cela pose la question de savoir si les effets phénotypiques observés après l'exposition sont bien liés à une perturbation œstrogénique. Finalement, il faut noter qu'aucun des modèles transgéniques actuellement disponibles chez le poisson ne permet la détection d'une activation œstrogénique à des stades embryonnaires précoces.

Des systèmes similaires ont été également développés chez le Xénope. Ainsi, une lignée transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène TH-bZIP a été utilisée pour suivre les effets du bisphénol A sur la fonction thyroïdienne (Fini et coll., 2007). TH-bZIP est en effet un gène régulé par ces hormones et il a été montré que le bisphénol avait, comme cela a été montré chez les mammifères, un effet inhibiteur sur la fonction thyroïdienne (Fini et coll., 2007).

## Études chez les poissons téléostéens

La quasi totalité des études menées chez les poissons téléostéens l'ont été en considérant que le BPA était un xéno-œstrogène et ont donc mesuré des paramètres phénotypiques liés à cette activité œstrogénique. Les principales espèces étudiées dans ces dispositifs sont le médaka (*Oryzias latipes*) et le zebrafish (*Danio rerio*) mais d'autres espèces comme la truite (*Oncorhynchus mykiss*), le killifish (*Fundulus heteroclitus*), parmi de nombreuses autres, ou même une espèce hermaphrodite comme *Rivulus marmoratus* ont été utilisées. Il n'est donc pas possible de dresser ici une liste exhaustive des travaux qui ont été menés. Ces modèles ont bien sûr l'avantage de tester la présence de molécules œstrogéniques directement dans les eaux en exposant directement les adultes ou les embryons. Il est ainsi possible assez directement de faire le lien entre un effet observé à une certaine concentration et les quantités de perturbateurs endocriniens présents dans une rivière donnée (Kashiwada et coll., 2002).

## Activation des récepteurs nucléaires des œstrogènes

La capacité du BPA à activer des récepteurs des œstrogènes de différentes espèces a été étudiée. On observe des différences faibles au niveau des EC50<sup>20</sup>

20. Concentration molaire d'un agoniste, qui produit 50 % de la réponse maximale pour cet agoniste.

observées. Ainsi, Matthews et coll. (2002), dans un test sur cellules mammaires humaines (MCF-7), mené avec le domaine de fixation du ligand de ER $\alpha$  de différentes espèces lié au domaine de fixation à l'ADN de Gal4, obtiennent des valeurs de EC50 allant de 0,3 à 3  $\mu$ M avec les activités les plus fortes pour les récepteurs de souris et de truite arc-en-ciel et des activités plus faibles pour les récepteurs de poulet ou de Xénope. Des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles cellulaires de poisson (cellules gonadiques RTG-2 ; lignée d'hépatome PLHC1) (Ackermann et coll., 2002 ; Rutishauser et coll., 2004 ; Olsen et coll., 2005 ; Cosnefroy et coll., 2009). À notre connaissance, aucun test de ce type n'a encore été réalisé sur les ER $\beta$  clonés chez les poissons ou le Xénope.

### Différents tests

Dans un premier type de test, les effets du bisphénol A sont étudiés en terme de toxicité générale sur des paramètres très intégrés : la survie (Nagel, 2002 ; Kashiwada et coll., 2002 ; Ishibashi et coll., 2005), la capacité de ponte (Shioda et Wakabayashi, 2000), la capacité des œufs à éclore (Shioda et Wakabayashi, 2000 ; Kashiwada et coll., 2002 ; Segner et coll. 2003), le développement normal des embryons (Pastva et coll., 2001 ; Duan et coll., 2008), la présence d'ovotestis c'est-à-dire l'apparition chez un poisson mâle d'une gonade comprenant à la fois les aspects des testicules et des ovaires (Kang et coll., 2002). L'ensemble de ces paramètres phénotypiques est utilisé dans un test bien cadré, le test DarT (Nagel, 2002). En se basant sur ce type d'expériences et bien que des différences parfois significatives puissent être observées d'un paramètre à l'autre et en fonction des dispositifs d'exposition utilisés, des effets à des doses à partir de 100  $\mu$ g/l ont été obtenus.

D'autres tests mesurent des effets plus directement œstrogéniques et la plupart d'entre eux se focalisent sur la mesure de l'induction des vitellogénines chez les mâles. Ces protéines sont normalement produites par le foie chez les femelles, passent dans la circulation générale et vont s'accumuler dans l'œuf. L'exposition des mâles (zebrafish ou medaka) aux œstrogènes induit la synthèse de vitellogénine et cela offre donc un test simple pour mesurer les effets du BPA (Segner et coll., 2003 ; Van der Belt et coll., 2003 ; Yamaguchi et coll., 2005 ; Muncke et coll., 2007). Ceci a même débouché sur un test utilisé en routine, le test MolDarT qui permet de détecter des effets du BPA à des concentrations de 10  $\mu$ M. De nombreuses autres espèces de poissons ont été utilisées dans ce type de test (Segner et coll., 2003 ; Van der Belt et coll., 2003 ; Pait et coll., 2003 ; Seo et coll., 2006). Lee et coll. (2002) ont observé des effets similaires en étudiant chez le medaka un autre gène sensible aux œstrogènes, la choriogénine : une induction après 6 jours de traitements à 50  $\mu$ g/l de BPA a été obtenue. Finalement, il faut noter que des gènes différents, non liés à la vitellogénine, ont également été utilisés comme marqueurs : c'est le cas de ER $\alpha$ , AR, les aromatasés, CYP19 (Min et coll., 2003 ; Tabata et coll., 2003 et 2004 ; Yamaguchi et coll., 2005 ; Lee et coll., 2006 ;

Diotel et coll., 2010) avec des effets le plus souvent positifs mais parfois également des effets inhibiteurs sur leur niveau d'expression. En général, ces tests sont plus sensibles que les tests purement morphologiques et montrent un effet à des concentrations de 100 µg/l, la voie majoritaire d'exposition étant d'ajouter simplement, le plus souvent pendant quelques jours, le BPA dans l'eau des aquariums dans lequel vivent des mâles adultes.

### Autres approches

Enfin, des travaux plus mécanistiques permettent d'affiner en termes moléculaires les effets du BPA. Des approches transcriptomiques ont permis de mettre en évidence le réseau de gènes modifiés après une exposition au BPA et de comparer celui-ci aux gènes dont l'expression est altérée par les œstrogènes. Ceci a été fait chez le zebrafish (Kausch et coll., 2008) et chez la carpe (Moens et coll., 2006 et 2007) et dans les deux cas les gènes exprimés dans le foie ont été étudiés. Les résultats dans les deux espèces montrent que le BPA régule une série de gènes spécifiques différents de ceux régulés par les œstrogènes. Mais si dans les expériences menées chez la carpe le profil transcriptionnel du BPA est globalement proche de celui observé avec des produits clairement œstrogéniques comme l'éthinylœstradiol, ce n'est pas le cas chez le zebrafish. Chez cette espèce, 211 gènes sont régulés par les œstrogènes alors que seulement 47 le sont par le bisphénol. Les seuls gènes en commun régulés par les deux produits sont les vitellogénines. Ces résultats posent la question de la validité des approches visant à conclure à l'œstrogénicité d'un produit en utilisant simplement l'induction de ces gènes comme critère. La comparaison détaillée des profils transcriptionnels générés par le BPA et les œstrogènes apportera certainement des éléments clés pour mieux caractériser les effets de ce produit en termes de mécanismes d'action.

Un modèle amphibien, le xénope (*Xenopus laevis*), a également été utilisé pour caractériser les effets du BPA. Des traitements de têtards à des doses de 10 ou 100 nM de BPA induisent une féminisation de ces derniers bien que cet effet ne soit pas retrouvé dans tous les types de traitements effectués, notamment lorsqu'on modifie la période d'exposition (Pickford et coll., 2003 ; Levy et coll., 2004). Comme chez les poissons, le BPA peut induire l'expression ou la synthèse de vitellogénine chez le xénope mais il n'est que faiblement actif par rapport à l'œstradiol puisqu'il ne montre que 0,008 % de l'activité du 17β-œstradiol (Mitsui et coll., 2007).

Des effets différents, agissant sur d'autres voies de signalisation que celle des ER ont également été observés chez le Xénope. Une exposition à des doses de 20 µM de BPA à des stades précoces de développement (avant le stade 10) induit des malformations de la région céphalique, associées à l'induction d'une apoptose dans le cerveau et la moelle épinière des animaux traités (Oka et coll., 2003 ; Sone et coll., 2004). Cet effet développemental a été associé à des anomalies de la voie Notch et le BPA est en fait capable d'inhiber

l'activité de la gamma-sécrétase (Imaoka et coll., 2007 ; Baba et coll., 2009). Plus récemment, une activité du BPA sur la voie des hormones thyroïdiennes et donc sur le contrôle de la métamorphose a été mise en évidence (Heimeier et Shi, 2010). Le BPA à des doses fortes (20  $\mu\text{M}$ ) entraîne une décélération de la métamorphose induite par les hormones thyroïdiennes et diminue l'expression du récepteur TR $\beta$  (Iwamuro et coll., 2003). Cet effet a été reproduit à des doses plus faibles (0,1  $\mu\text{M}$ ) sur des cultures de queues de têtard et ces auteurs ont également montré un effet sur l'expression RXR $\gamma$ , le partenaire d'hétérodimérisation de TR $\beta$  (Iwamuro et coll., 2006). En focalisant leur étude sur le remodelage intestinal induit par les hormones thyroïdiennes au cours de la métamorphose, Heimeier et coll. (2009) ont montré un effet clairement antagoniste du BPA, capable d'inhiber l'action régulatrice des hormones thyroïdiennes sur de nombreux gènes cibles. Ces données montrent donc que le spectre d'action du BPA est bien plus large que la seule action œstrogénique communément admise.

**En conclusion**, chez les mammifères, l'utilisation de modèles génétiquement modifiés pour détecter une activité œstrogénique en réponse au BPA est encore peu développée au niveau des tissus suspectés d'être de potentielles cibles de ce perturbateur (ovaire, utérus, prostate...).

Parallèlement, des lignées transgéniques de poissons confirment la faible œstrogénicité du BPA *in vivo*. Aucun des modèles transgéniques actuellement disponibles chez le poisson ne permet la détection d'une activation œstrogénique à des stades embryonnaires précoces.

La quasi-totalité des études menées chez les poissons téléostéens (medaka, zebrafish) ou d'autres espèces comme la truite, le killifish... ont mesuré des paramètres phénotypiques liés à une activité œstrogénique. Ces modèles ont l'avantage de tester la présence de molécules œstrogéniques directement dans les eaux en exposant directement les adultes ou les embryons.

Par des approches transcriptomiques, réalisées chez le zebrafish et la carpe, les gènes exprimés dans le foie ont été étudiés. Les résultats montrent que le BPA régule une série de gènes spécifiques différents de ceux régulés par les œstrogènes. Ces résultats posent la question de la validité des approches visant à conclure à l'œstrogénicité d'un produit en utilisant simplement l'induction de ces gènes comme critère. La comparaison détaillée des profils transcriptionnels générés par le BPA et les œstrogènes apportera certainement des éléments clés pour mieux caractériser les effets de ce produit en termes de mécanismes d'action.

De nouveaux modèles d'études, notamment les cellules humaines, pour caractériser chez l'homme les effets et les mécanismes d'actions du BPA et de ses éventuels produits de substitution s'avèrent indispensables. Les futures évaluations de risque produites par les agences sanitaires devront intégrer ces nouvelles approches.

**BIBLIOGRAPHIE**

ACKERMANN GE, BROMBACHER E, FENT K. Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents. *Environ Toxicol Chem* 2002, **21** : 1864-1875

BABA K, OKADA K, KINOSHITA T, IMAOKA S. Bisphenol A disrupts Notch signaling by inhibiting gamma-secretase activity and causes eye dysplasia of *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci* 2009, **108** : 344-355

CHEN H, HU J, YANG J, WANG Y, XU H, et coll. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. *Aquat Toxicol* 2010, **96** : 53-61

COSNEFROY A, BRION F, GUILLET B, LAVILLE N, PORCHER JM, et coll. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicol In Vitro* 2009, **23** : 1450-1454

DIOTEL N, PAGE YL, MOURIEC K, TONG SK, PELLEGRINI E, et coll. Aromatase in the brain of teleost fish : expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 2010, **31** : 172-192

DUAN Z, ZHU L, ZHU L, KUN Y, ZHU X. Individual and joint toxic effects of pentachlorophenol and bisphenol A on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008, Mar 20. [Epub ahead of print]

FINI JB, LE MEVEL S, TURQUE N, PALMIER K, ZALKO D, et coll. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 5908-5914

HEIMEIER RA, DAS B, BUCHHOLZ DR, SHI YB. The xenestrogen bisphenol A inhibits postembryonic vertebrate development by antagonizing gene regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 2009, **150** : 2964-2973

HEIMEIER RA, SHI YB. Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development : Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *Gen Comp Endocrinol* 2010, **168(2)** : 181-189

HONMA S, SUZUKI A, BUCHANAN DL, KATSU Y, WATANABE H, IGUCHI T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* 2002, **16** : 117-122

IMAOKA S, MORI T, KINOSHITA T. Bisphenol A causes malformation of the head region in embryos of *Xenopus laevis* and decreases the expression of the ESR-1 gene mediated by Notch signaling. *Biol Pharm Bull* 2007, **30** : 371-374

ISHIBASHI H, WATANABE N, MATSUMURA N, HIRANO M, NAGAO Y, et coll. Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sci* 2005, **77** : 2643-2655

IWAMURO S, SAKAKIBARA M, TERAOKA M, OZAWA A, KUROBE C, et coll. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 2003, **133** : 189-198

IWAMURO S, YAMADA M, KATO M, KIKUYAMA S. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and

down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Sci* 2006, **79** : 2165-2171

KANG IJ, YOKOTA H, OSHIMA Y, TSURUDA Y, OE T, et coll. Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 2002, **21** : 2394-2400

KASHIWADA S, ISHIKAWA H, MIYAMOTO N, OHNISHI Y, MAGARA Y. Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Res* 2002, **36** : 2161-2166

KAUSCH U, ALBERTI M, HAINDL S, BUDCZIES J, HOCK B. Biomarkers for exposure to estrogenic compounds : gene expression analysis in zebrafish (*danio rerio*). *Environ Toxicol* 2008, **23** : 15-24

LAWS SC, CAREY SA, FERRELL JM, BODMAN GJ, COOPER RL. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 2000, **54** : 154-167

LEE C, NA JG, LEE KC, PARK K. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. *Aquat Toxicol* 2002, **61** : 233-241

LEE YM, SEO JS, KIM IC, YOON YD, LEE JS. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345** : 894-903

LEGLER J, BROEKHOF JLM, BROUWER A, LANSER PH, MURK AJ, et coll. A novel in vivo bioassay for (xeno-)estrogens using transgenic zebrafish. *Environmental Science and Technology* 2000, **34** : 4439-4444

LEMMEN JG, ARENDS RJ, VAN BOXTEL AL, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. Tissue- and time-dependent estrogen receptor activation in estrogen reporter mice. *J Mol Endocrinol* 2004a, **32** : 689-701

LEMMEN JG, ARENDS RJ, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2004b, **112** : 1544-1549

LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, KLOAS W. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res* 2004, **94** : 102-111

MARKEY CM, LUQUE EH, MUNOZ DE TORO M, SONNENSCHN C, SOTO AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1215-1223

MATTHEWS JB, FERTUCK KC, CELIUS T, HUANG YW, FONG CJ, ZACHAREWSKI TR. Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen receptors from various species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002, **82** : 181-194

MIN J, LEE SK, GU MB. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in *oryzias latipes* liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2003, **17** : 272-277

MITSUI N, TOOI O, KAWAHARA A. Vitellogenin-inducing activities of natural, synthetic, and environmental estrogens in primary cultured *Xenopus laevis* hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007, **146** : 581-587

MOENS LN, VAN DER VEN K, VAN REMORTEL P, DEL-FAVERO J, DE COEN WM. Expression profiling of endocrine-disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicol Sci* 2006, **93** : 298-310

MOENS LN, VAN DER VEN K, VAN REMORTEL P, DEL-FAVERO J, DE COEN WM. Gene expression analysis of estrogenic compounds in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) using a custom cDNA microarray. *J Biochem Mol Toxicol* 2007, **21** : 299-311

MUNCKE J, JUNGHANS M, EGGEN RI. Testing estrogenicity of known and novel (xeno-) estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 2007, **22** : 185-193

NAGEL R. DarT : The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002, **19** : 38-48

OKA T, ADATI N, SHINKAI T, SAKUMA K, NISHIMURA T, KUROSE K. Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **312** : 877-882

OLSEN CM, MEUSSEN-ELHOLM ET, HONGSLO JK, STENERSEN J, TOLLEFSEN KE. Estrogenic effects of environmental chemicals : an interspecies comparison. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005, **141** : 267-274

PAIT AS, NELSON JO. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquat Toxicol* 2003, **64** : 331-342

PASTVA SD, VILLALOBOS SA, KANNAN K, GIESY JP. Morphological effects of Bisphenol-A on the early life stages of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 2001, **45** : 535-541

PICKFORD DB, HETHERIDGE MJ, CAUNTER JE, HALL AT, HUTCHINSONTH. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 2003, **53** : 223-235

RUTISHAUSER BV, PESONEN M, ESCHER BI, ACKERMANN GE, AERNI HR, et coll. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ Toxicol Chem* 2004, **23** : 857-864

SEGNER H, NAVAS JM, SCHÄFERS C, WENZEL A. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003, **54** : 315-322

SEO JS, LEE YM, JUNG SO, KIM IC, YOON YD, LEE JS. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **346** : 213-223

SHIODA T, WAKABAYASHI M. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 2000, **40** : 239-243

SONE K, HINAGO M, KITAYAMA A, MOROKUMA J, UENO N, et coll. Effects of 17beta-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *Gen Comp Endocrinol* 2004, **138** : 228-236

TABATA A, MIYAMOTO N, OHNISHI Y, ITOH M, YAMADA T, et coll. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 2003, **47** : 51-57

TABATA A, WATANABE N, YAMAMOTO I, OHNISHI Y, ITOH M, et coll. The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci Technol* 2004, **50** : 125-132

TAKAGI H, SHIBUTANI M, MASUTOMI N, UNEYAMA C, TAKAHASHI N, et coll. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch Toxicol* 2004, **78** : 97-105

TER VELD MG, ZAWADZKA E, RIETJENS IM, MURK AJ. Estrogenicity of food-associated estrogenic compounds in the fetuses of female transgenic mice upon oral and IP maternal exposure. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 133-139

TINWELL H, JOINER R, PATE I, SOAMES A, FOSTER J, ASHBY J. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000, **32** : 118-126

TINWELL H, HASEMAN J, LEFEVRE PA, WALLIS N, ASHBY J. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 339-348

TODA K, MIYAURA C, OKADA T, SHIZUTA Y. Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (*Cyp19*). *Eur J Biochem* 2002, **269** : 2214-2222

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

VAN DER BELT K, VERHEYEN R, WITTERS H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003, **56** : 271-281

YAMAGUCHI A, ISHIBASHI H, KOHRA S, ARIZONO K, TOMINAGA N. Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 2005, **72** : 239-249

ZENG Z, SHAN T, TONG Y, LAM SH, GONG Z. Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environ Sci Technol* 2005, **39** : 9001-9008