

**Approche translationnelle des biomarqueurs précoces
d'une exposition prénatale et néonatale aux
perturbateurs endocriniens**

FUDVOYE JULIE

Promoteur : Prof. Parent Anne-Simone

Année académique 2022-2023



Approche translationnelle des biomarqueurs précoces d'une exposition prénatale et néonatale aux perturbateurs endocriniens

Julie Fudvoye

Thèse rédigée en vue de l'obtention du titre de Doctorat en Sciences
Médicales



Année académique 2022-2023

Membres du jury

Pr. C Charlier, Université de Liège (présidente)

Pr. P Delvenne, Université de Liège

Pr. I Gies, Vrije Universiteit Brussel

Pr. F Kridelka, Université de Liège

Pr. AS Parent, Université de Liège (promoteur)

Pr. S Perrier d’Hauterive, Université de Liège

Pr. MC Seghaye, Université de Liège

Pr. C Viguié, Université de Toulouse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord adresser ici mes remerciements aux différentes personnes qui par leur présence, leur soutien, leur bonne humeur, leur humour et leur amour ont fait de ce travail un projet collectif bien plus qu'individuel.

Je voudrais exprimer un merci tout particulier à Anne-Simone, qui a toujours été présente à mes côtés, que ça soit dans mon travail clinique ou de recherche. En effet, tu as le don de donner la confiance, de soutenir sans diriger, de rester optimiste en toutes circonstances et tes idées sont toujours des plus judicieuses pour faire avancer les choses. Merci pour tes nombreux conseils lors de la rédaction de ce manuscrit. Je me sens très chanceuse d'avoir pu travailler à tes côtés mais aussi de savoir que cela va continuer après.

J'ai une pensée également pour Monsieur Bourguignon, qui a fait partie intégrante de mes premiers pas en endocrinologie pédiatrique et puis au laboratoire. Même si il nous a malheureusement quittés, je continue au quotidien à bénéficier de ce que j'ai pu apprendre à ses côtés.

Ensuite, je voudrais remercier toutes les personnes du laboratoire qui m'ont toujours très chaleureusement accueillie et beaucoup aidée. Le climat de travail si convivial au sein de notre laboratoire a clairement fait en sorte que je n'ai jamais regretté de m'être lancée dans cette aventure. Je pense bien sûr à Arlette que je ne remercierai jamais assez pour son aide, son écoute, ses conseils, sa disponibilité et son savoir infini par rapport au rudiment du laboratoire. Je remercie aussi Delphine et Anneline, qui ont toujours été disponibles pour m'épauler dans mon travail et avec qui j'ai partagé de très bons moments lors de mes semaines au labo. Je pense également à David et Chloé qui ont été très impliqués dans ce travail ainsi que les autres membres du laboratoire : Quentin, Eléna et Charlotte.

Par ailleurs, ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien du Prof. MC Seghaye. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé afin que je puisse mener à bien ce projet ainsi que vos conseils et vos encouragements tout au long de ce travail. J'en profite aussi pour remercier les autres membres de mon comité de thèse qui ont toujours été d'une oreille attentive, amenant des pistes de réflexion complémentaires et rigoureuses, me menant à considérer les choses sous des angles nouveaux ou différents.

Merci également au Prof. C Vigué et au Prof. I Gies qui ont généreusement accepté de faire partie du jury de cette thèse et de partager avec nous leur expertise sur cette thématique si passionnante.

Je tiens aussi à adresser un merci tout particulier à Madame Lebrethon, Caroline et Sara, qui m'accompagnent au quotidien en clinique. Merci pour vos encouragements et votre flexibilité afin d'assurer le suivi clinique lors de mon travail au laboratoire.

Pour finir, j'aimerais remercier ceux qui m'ont appris l'importance du savoir, de la découverte et du travail, mes parents. Tout au long de cette aventure, votre présence et votre disponibilité ont constitué un soutien sans faille. Je remercie aussi mes frères et sœurs et apparentés pour leur soutien, thib et line pour les soirées mise en page notamment. Un énorme merci à « la Mech » pour ses encouragements au quotidien et son soutien à toutes les étapes de ce projet. Merci à mes amies les plus proches qui m'ont permis et me permettent toujours de garder un équilibre entre le travail et les moments de détente, de nature etc... Enfin, merci à Berni, Tom et Mathis ... avec vous 3 à mes côtés, pas difficile de relativiser et de mesurer la chance que j'ai!

Résumé

Notre société fait face actuellement à un problème de santé publique grandissant lié à la production et la présence croissantes de produits chimiques synthétiques qui peuvent interférer avec notre système endocrinien. Ces substances sont appelées perturbateurs endocriniens (PEs). Huit cents composés chimiques sont actuellement considérés comme PEs. Cependant, la plupart des nouvelles substances mises sur le marché ne sont pas testées pour leurs éventuelles propriétés toxiques ou de perturbation endocrinienne. De plus, la démonstration formelle de l'implication d'un PE donné reste difficile à établir en raison de toutes une séries de caractéristiques qui leur sont propres : effets à faibles doses sans suivre une relation dose-réponse nécessairement linéaire et, dès lors, sans possibilité de définir un seuil de toxicité ; effets variables en fonction de la période d'exposition ; exposition à des mélanges qui associent des dizaines voire des centaines de PEs ubiquitaires dont la rémanence dans l'environnement et l'organisme est variable et dont les effets surviennent après un délai variable et parfois très long après l'exposition.

Les périodes fœtale et postnatale précoce représentent des périodes critiques par rapport aux effets des PEs puisqu'elles sont caractérisées par une plasticité qui, sous l'influence de facteurs environnementaux, permet la mise en place de processus homéostatiques qui vont influencer l'état de santé de l'individu tout au long de la vie. Cette programmation précoce de la santé répond au concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies (DOHaD).

Les données obtenues chez l'humain et chez le rongeur suggèrent qu'une exposition périnatale aux PEs est associée à des altérations du contrôle de la balance énergétique et de la reproduction qui peuvent se manifester plus tardivement dans la vie. Cependant, à ce jour, les études n'ont pu identifier des

biomarqueurs précoces des effets de l'exposition aux PE, qui pourraient justifier la mise en place de stratégies de prévention vis-à-vis de l'exposition des femmes enceintes et du jeune enfant.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet visant à identifier des marqueurs précoces au niveau du placenta murin des effets de l'exposition au Bisphénol A (BPA), un PE largement répandu dans notre environnement.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que l'exposition durant la gestation à une forte dose de BPA (10 mg/kg/jour) modifiait la méthylation de l'ADN de certains gènes placentaires avec un effet différent selon le sexe. La même exposition modifiait également l'expression de gènes spécifiques au sein des placentas femelles. Ces premiers résultats ont montré que le placenta pouvait fournir des biomarqueurs précoces de l'exposition au BPA.

Sur base de ces données, nous avons voulu étudier les altérations épigénétiques et/ou transcriptomiques au sein des placentas femelles induites par une exposition à des doses environnementales de BPA et de Bisphénol S (BPS), un substitut du BPA de plus en plus utilisé en raison de la législation concernant l'utilisation du BPA. L'exposition commençait une semaine avant le début de la gestation et les doses utilisées étaient les suivantes : 4 µg/kg/jour, la dose journalière tolérable définie par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) pour le BPA et 25 ng/kg/jour, une dose cohérente avec l'exposition environnementale.

L'exposition au BPS 25 ng/kg/jour affectait le déroulement de la grossesse. La proportion des femelles donnant naissance à des petits après la mise à mâle était diminuée dans le groupe exposé à la plus faible dose de BPS comparé au groupe contrôle. L'exposition à la plus faible dose de BPS entraînait également une restriction de croissance fœtale et postnatale chez les femelles. Le timing pubertaire de ces femelles n'était pas modifié après exposition prénatale et durant la lactation à la plus faible dose de BPS.

Afin d'identifier les altérations transcriptomiques placentaires qui pourraient médier les effets du BPA et/ou du BPS sur les paramètres de gestation et de croissance fœtale et postnatale, un séquençage du transcriptome entier a été réalisé au sein des placentas femelles. L'exposition environnementale au BPA et au BPS modifiait de façon significative l'expression d'un faible nombre de gènes (BPA 25 ng/kg/j : 3 ; BPA 4 µg/kg/j : 6 ; BPS 25 ng/kg/j : 5 et BPS 4 µg/kg/j : 3). Parmi les gènes dont l'expression était diminuée au sein des placentas femelles après exposition au BPS 25 ng/kg/jour, 3 sont connus comme jouant un rôle dans l'implantation et la placentation (*Wnt7b*, *AABR07002659.1* and *Fut2*). En utilisant une *p-value* moins stricte, une analyse plus globale des gènes dont l'expression était modifiée après exposition au BPS 25 ng/kg/jour grâce à *Gene Ontology* a mis en évidence l'implication de ces derniers dans le développement fœtal ou encore dans l'axe placenta-cerveau.

L'exposition à la plus faible dose de BPS diminuait l'expression du gène *Steroid Receptor Coactivator 2 (SRC2)*, un coactivateur du récepteur aux oestrogènes au sein des placentas femelles. En utilisant la technique du séquençage au bisulfite, nous avons mis en évidence une diminution de la méthylation au sein du promoteur de *SRC2* après exposition à cette faible dose de BPS (25 ng/kg/j).

Sur base de ces résultats, il apparaît que le transcriptome et l'épigénome placentaire sont sensibles à l'exposition à des doses environnementales de BPA et de BPS, et pourraient médier les effets de ces derniers sur le développement fœtal.

Abstract

Our society is currently facing a growing public health problem due to increasing production and presence of synthetic chemicals that can interfere with our endocrine system. These substances are called endocrine disruptors chemicals (EDCs). Eight hundred chemical compounds are currently considered as EDCs. However, most of the new substances coming onto the market are not tested for their potential toxic or endocrine disrupting properties. Moreover, the demonstration of the involvement of a given EDC remains difficult in humans because of their specific characteristics : non linear dose-response relationship and, consequently, the impossibility to define a toxicity threshold; effects depending on the critical periods of exposure; exposure to complex mixtures of ubiquitous EDCs with variable persistence in the body and the environment and with effects occurring after a variable and sometimes very long latency between exposure and manifestation of health consequences.

Fetal and early postnatal life are critical periods as far as exposure to EDCs because of the shaping of the homeostatic mechanisms that takes place in response to environmental factors. This early programming of health fits into the concept of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD).

Animal and human studies have brought evidence that perinatal exposure to EDCs affected the control of energy balance and reproduction with most of the effects observed later in life. So far, human studies have failed to identify early biomarkers of effects of prenatal exposure to EDCs which could justify the implementation of preventive strategies, especially for pregnant women and young children.

Based on that, our project aims to identify early biomarkers in the rat placenta of effects of exposure to Bisphenol A (BPA), an EDC widely present in our environment.

In the first part of this work, we showed that exposure during gestation to a high dose of BPA (10 mg/kg/day) modified the DNA methylation of some placental genes, with a sex specific effect. Exposure to BPA 10 mg/kg/day also altered mRNA expression of specific genes in female placentas. Those results highlighted that the placenta could provide early biomarkers of effects of BPA exposure.

Based on these data, we aimed to identify epigenetic and/or transcriptomic alterations in female placentas induced by exposure to environmental doses of BPA and Bisphenol S (BPS), a BPA substitute increasingly used due to legislation regarding BPA. Exposure started one week before mating and during gestation with doses of 4µg/kg/day, the tolerable daily intake defined by the European Food Safety Authority (EFSA) for BPA and 25 ng/kg/day, a dose consistent with environmental exposure.

Females exposed to the lowest dose of BPS (25 ng/kg/day) before mating had a reduced mating success rate compared to females in the control group. Exposure to the lowest dose of BPS also resulted in fetal and postnatal growth restriction in females. The pubertal timing of these females was not altered after prenatal exposure and during lactation to the lowest dose of BPS.

To identify placental transcriptomic alterations that might mediate the effects of BPA and/or BPS on fetal and postnatal growth parameters, RNA sequencing was performed in female placentas. Environmental exposure to BPA and BPS significantly altered the expression of a small set of genes (BPA 25 ng/kg/d: 3; BPA 4 µg/kg/d: 6; BPS 25 ng/kg/d: 5 and BPS 4 µg/kg/d: 3). Among the genes with decreased expression in female placentas after exposure to BPS 25 ng/kg/day, 3 are known to play a role in implantation and placentation (*Wnt7b*, *AABR07002659.1*

and *Fut2*). A functional enrichment analysis of differentially affected genes after exposure to this very low dose of BPS based on a less restrictive *p value* revealed their involvement in fetal development and in the placenta-brain axis.

Exposure to the lowest dose of BPS decreased the expression of the *Steroid Receptor Coactivator 2 (SRC2)* gene, a coactivator of the estrogen receptor, in female placentas. Using bisulfite sequencing, we showed a decrease of *SRC2* promoter methylation after exposure to the lowest dose of BPS (25 ng/kg/d).

Based on those results, it appears that the placental transcriptome and epigenome are sensitive to environmentally relevant doses of BPA and BPS, and may mediate their effects on fetal development.

Liste des articles

Publications en premier auteur

Fudvoye J, Bourguignon JP, Parent AS. Endocrine-disrupting chemicals and human growth and maturation: a focus on early critical windows of exposure. *Vitamines and Hormones*, 2014

Fudvoye J, Franssen D, Naveau E, Pinson A, Gérard A, Bourguignon JP, Parent AS. LA PERTURBATION ENDOCRINIENNE : entre enjeux de recherche, enjeux de santé publique et enjeux de pratique quotidienne. *Revue Médicale de Liège*, 2014

Fudvoye J, Lopez-Rodriguez D, Franssen D, Parent AS. Endocrine disrupters and possible contribution to pubertal changes. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2019

Publications en tant que co-auteur

Parent AS, Franssen D, **Fudvoye J**, Gérard A, Bourguignon JP. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2015.

Bourguignon JP, Juul A, Franssen D, **Fudvoye J**, Pinson A, Parent AS. Contribution of the Endocrine Perspective in the Evaluation of Endocrine Disrupting Chemical Effects: The Case Study of Pubertal Timing. *Hormone Research in Paediatrics*, 2016

Parent AS, Franssen D, **Fudvoye J**, Pinson A, Bourguignon JP. Current Changes in Pubertal Timing: Revised Vision in Relation with Environmental Factors Including Endocrine Disruptors. *Endocrine development*, 2016

Liste des abréviations

AhR : récepteur d'aryl hydrocarbure

AR : récepteur aux androgènes

BPA : bisphénol A

BPS : bisphénol S

CTEV : cytotrophoblaste extravilleux

CTV : cytotrophoblaste vilieux

DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DES : diéthylstilbestrol

DNMT : ADN méthyltransférases

DOHaD : Developmental Origin of Health and Disease

ECHA : European Chemicals Agency

EFSA : European Food Safety Authority

EPA : US Environmental Protection Agency

ER : récepteur aux oestrogènes

FDA : Food and Drug administration

GD : gestational day

GPR30 : G-Protein coupled Receptor 30

IMC : indice de masse corporelle

JPN : jour postnatal

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level

Log FC : log fold change

MTD : dose maximum tolérable

mg/kg/j : milligramme/ kilogramme/ jour

ng/kg/j : nanogramme/ kilogramme/ jour

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PBBs : biphényles polybromés

PCBs : biphényles polychlorés

PE : perturbateur endocrinien

Rfd : dose de référence

SASE : substances actives sur le système endocrinien

SRC2 : steroid receptor coactivator 2

TET : ten eleven translocation

µg/kg/j : microgramme/ kilogramme/ jour

UGT : uridine diphospho-glucuronosyltransferase

Table des matières

Remerciements	V
Résumé	VII
Abstract	XI
Liste des articles	XV
Liste des abréviations	XVII
Table des matières	XIX
Contexte de travail et justification des recherches entreprises	3
Introduction	11
1. <i>L'origine développementale de la santé et des pathologies (Developmental Origin of Health and Disease) (DOHaD)</i>	11
2. <i>Les perturbateurs endocriniens : principes généraux</i>	12
2.1 Définition d'un perturbateur endocrinien	12
2.2 Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens	15
2.3 Effets non monotones et effets à faibles doses	17
2.4 Fenêtre de vulnérabilité par rapport à l'exposition aux perturbateurs endocriniens	21
2.5 Bisphénol A et Bisphénol S	23
2.5.1 Origine du BPA et du BPS et exposition	23
2.5.2 Biodisponibilité du BPA et du BPS	30
2.5.3 Mode d'action du BPA et du BPS	32
2.5.4 Effets perturbateurs endocriniens du BPA et du BPS	33
3. <i>Implication des mécanismes épigénétiques dans le DOHaD et la perturbation endocrinienne</i>	49
3.1 Définition et aspects généraux	49
3.2 Méthylation de l'ADN	52
3.3 Implication des mécanismes épigénétiques dans le DoHaD	54
3.4 Effets du BPA et du BPS sur la méthylation de l'ADN	56
4. <i>Implication du placenta dans le DOHaD</i>	59
4.1 Caractéristiques morphologiques du placenta humain et murin	59
4.2 Fonction du placenta	62
4.3 Effets du BPA et du BPS au niveau du placenta	64
4.3.1 Effets du BPA et du BPS sur l'épigénome et le transcriptome placentaire	64
4.3.2 Effets du BPA et du BPS sur la morphologie placentaire	66

Objectifs	71
Résultats	75
<i>Section 1</i>	75
<i>Effets différents selon le sexe d'une exposition prénatale à une forte dose de BPA sur l'épigénome et le transcriptome placentaire</i>	
<i>Section 2</i>	95
<i>Effets de l'exposition prénatale à des doses environnementales de BPA et de BPS sur le transcriptome au sein des placentas femelles : implication de mécanismes épigénétiques et conséquences sur la placentation et la croissance fœtale</i>	
Discussion et perspectives	133
1. <i>Par quels mécanismes le Bisphénol A et le Bisphénol S altèrent-ils l'épigénome placentaire ?</i>	133
2. <i>Les marqueurs épigénétiques peuvent-ils être utilisés pour améliorer l'évaluation du risque associé aux PEs?</i>	135
3. <i>Le placenta constitue-t-il un tissu sensible comme marqueur de l'exposition aux PEs?</i>	138
4. <i>Quid du caractère translationnel de nos recherches ?</i>	139
5. <i>En pratique, quelles recommandations faire aux femmes enceintes par rapport à l'exposition aux PEs ?</i>	142
Références bibliographiques	147
Annexes	175

**Contexte de travail et justification des recherches
entreprises**

Contexte de travail et justification des recherches entreprises

La vie fœtale et postnatale précoce apparaît comme une période critique en raison des processus physiologiques qui s’y mettent en place et des pathologies qui peuvent y être prédéterminées, notamment sous l’influence de facteurs environnementaux tels que l’état nutritionnel ou l’exposition à des perturbateurs endocriniens (PEs) (Heindel et al. 2015).

L’organisation mondiale de la santé (OMS 2002) définit un PE comme « *une substance exogène ou un mélange de substances qui altère une ou des fonctions du système endocrinien et, conséquemment, cause des effets négatifs sur la santé d’un organisme, de sa progéniture ou d’une population* » (WHO/UNEP 2013). En raison de leur ubiquité et de leur présence croissante dans notre environnement, les PEs représentent un risque de santé à l’échelle des populations aussi bien que de l’individu.

Etant donné le rôle crucial des hormones stéroïdes ou thyroïdiennes dans le développement du fœtus et du nouveau-né, une modification de l’environnement hormonal du fœtus ou du jeune enfant par l’exposition aux PEs peut interférer avec la mise en place du contrôle de la reproduction (différenciation sexuelle, modification du timing pubertaire, infertilité, néoplasie) et du contrôle de la balance énergétique (croissance fœtale, obésité, syndrome métabolique) et peut influencer le neurodéveloppement (Fudvoye et al. 2014). La femme enceinte, le nouveau-né et le nourrisson sont donc des cibles privilégiées.

Cette « programmation » précoce de la santé d’un individu répond au concept de l’origine développementale de la santé et des pathologies, plus souvent connu

sous le nom de DOHaD, pour « *Developmental Origin of Health and Disease* ». L'implication de la perturbation endocrinienne dans le déterminisme d'affections ultérieures a été illustrée dans les années 1970 avec l'histoire du Diethylstilbestrol (DES), un composé oestrogénique puissant administré aux femmes enceintes pour prévenir le risque de fausses couches. Un risque accru d'adénocarcinome vaginal avait été objectivé chez les femmes une vingtaine d'années après exposition anténatale au DES (Herbst et al. 1971). L'utilisation du DES a bien évidemment été bannie mais par la suite, d'autres études ont mis en évidence que l'exposition développementale aux PE pouvait être associée à des anomalies du contrôle de la balance énergétique (altération de la croissance fœtale et postnatale notamment) et du contrôle de la reproduction (modification du timing pubertaire par exemple). Les effets de l'exposition précoce aux PE sous l'angle de l'origine fœtale des pathologies de l'adulte ont été revus dans l'article de synthèse de 2014 (Fudvoye et al. 2014, en annexe).

Le BPA est un composé chimique de synthèse utilisé depuis les années 1950 et dont la production annuelle n'a cessé de croître. Ses deux principales utilisations ont longtemps été la fabrication de plastique (de type polycarbonate) et de résines époxydes. Il intervient également dans la synthèse de certains retardateurs de flamme et comme révélateur dans les papiers thermiques (tickets de caisse notamment) (Vandenberg et al. 2007). Le BPA est très largement répandu dans notre environnement et cela est confirmé par la détection de BPA dans les urines de plus de 93% de la population aux Etats Unis (Calafat et al. 2005; Calafat et al. 2008). Chez l'humain, l'exposition prénatale au BPA (évaluée par plusieurs mesures des concentrations urinaires maternelles en BPA) peut altérer la croissance fœtale *in utero* et est associée à un faible poids de naissance (Vrachnis et al. 2021). Les effets du BPA sur le contrôle de la balance énergétique pourraient persister durant l'enfance puisque certaines études ont montré que l'exposition prénatale au BPA était positivement corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC) (Valvi et al. 2013),

à la circonférence abdominale (Guo et al. 2020) ou encore au pourcentage de masse grasse (Hoepner et al. 2016) durant l'enfance. A l'inverse, d'autres études ont rapporté une relation inverse avec l'IMC à l'âge de 4 ans (Harley et al. 2013) et 9 ans (Vafeiadi et al. 2016). Certaines études ont par ailleurs démontré des effets différents selon le sexe (Veiga-Lopez et al. 2015; Chou et al. 2011; Vafeiadi et al. 2016). Le timing pubertaire pourrait lui aussi être affecté par l'exposition précoce au BPA : les garçons exposés à des taux plus élevés de BPA *in utero* ont une avance de l'âge au moment de l'entrée en puberté (Berger et al. 2018) tandis que l'âge de la ménarche est retardé chez les filles exposées *in utero* de façon plus importante au BPA (l'exposition était attestée par la mesure des taux urinaires de BPA à 2 reprises durant la grossesse) (Berger et al. 2018). Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé les effets de l'exposition précoce au BPA sur le timing pubertaire, à la fois chez la fille (Watkins et al. 2014) et chez le garçon (Ferguson et al. 2014). Ces données illustrent d'une part les fenêtres critiques d'exposition par rapport aux effets du BPA mais aussi le fait que ces derniers peuvent différer selon le sexe (McCabe et al. 2017).

Le délai variable et long entre l'exposition précoce du fœtus et du nouveau-né aux PE et les effets observés durant l'enfance, à la puberté ou à l'âge adulte rend difficile l'établissement d'un lien causal. La mise en place de stratégies de prévention de l'exposition prénatale et postnatale précoce aux PE est subordonnée à la mise en évidence tôt dans la vie des effets des PE. Or, actuellement, il n'existe pas de biomarqueurs des effets précoces de ces PE chez l'humain.

Le placenta joue un rôle majeur dans l'homéostasie du fœtus. En effet, du fait de sa structure à la fois embryonnaire et maternelle et en raison de ses fonctions nutritive et endocrine, il est véritablement au centre d'un dialogue croisé materno-fœtal. Tant la croissance que la fonction du placenta sont soumis à une régulation dynamique par l'environnement. Une altération de l'environnement intra-utérin

peut affecter les fonctions placentaires et avoir des répercussions sur la croissance et le développement du fœtus (Burton et al. 2010). Il apparaît par ailleurs que le sexe de l'embryon peut moduler la réponse du placenta à une altération de son environnement avec un dimorphisme sexuel qui semble être constitutionnel au niveau du placenta (Gabory et al. 2009). Même si le placenta humain possède une structure anatomique qui lui est spécifique, il partage avec le placenta murin des caractéristiques communes qui font que l'étude de celui-ci offre une vue complémentaire sur les mécanismes impliqués dans le développement et la fonction du placenta. En effet, en dehors de leur placentation de type hémochoriale, les placentas humain et murin ont en commun une invasion profonde par les cellules trophoblastiques du myomètre ainsi qu'un remodelage des artères utérines spiralées, phénomène crucial pour la croissance et le développement du fœtus (Hemberger et al. 2020).

Les mécanismes épigénétiques sous-tendent la programmation de la santé d'un individu et sont particulièrement sensibles aux effets de l'environnement, en particulier durant la vie fœtale et postnatale précoce (Safi-Stibler and Gabory 2020). Finement régulés par des mécanismes épigénétiques, les gènes soumis à empreinte parentale jouent un rôle clé dans la croissance foeto-placentaire (Radford et al. 2012). Il a été démontré que l'exposition prénatale au BPA modifie l'expression de gènes soumis à empreinte au sein du placenta murin (Susiarjo et al. 2013). Ces données suggèrent que l'épigénétique placentaire pourrait constituer un marqueur de l'exposition intra-utérine aux PE et potentiellement médier les effets de ces derniers sur le développement de l'unité foeto-placentaire.

L'objectif premier de notre travail était de confirmer grâce à un modèle murin que le placenta offre des biomarqueurs précoces épigénétiques des effets de l'exposition prénatale à une dose élevée de BPA (connue comme pouvant affecter la méthylation de l'ADN).

Les résultats obtenus dans notre premier modèle expérimental ont constitué la base de la construction de notre deuxième modèle expérimental qui avait comme objectif d'étudier des biomarqueurs précoces placentaires des effets de l'exposition prénatale à des doses de BPA et de BPS compatibles avec une « exposition environnementale » et de les corrélés aux conséquences phénotypiques en terme de croissance fœtale et postnatale et contrôle de la maturation pubertaire. En effet, ces dernières années ont été marquées par la mise en place de mesures de restriction par rapport à l'utilisation du BPA dans de nombreux pays avec un remplacement progressif de ce dernier par des analogues structurels, tel que le BPS. Même si la capacité du BPS à interagir avec le système endocrinien et ainsi entraîner une perturbation endocrinienne est de plus en plus reconnue (Rochester and Bolden 2015), il existe à l'heure actuelle peu d'études concernant les effets de l'exposition précoce au BPS sur la santé, que ce soit sur le contrôle de la croissance et le contrôle de la reproduction. De plus, les effets épigénétiques du BPS sont à l'heure actuelle non connus.

Il est actuellement reconnu que le BPA fait partie des PE ayant des effets à des doses plus faibles que celles décrites comme inoffensives par les agences de régulation et que ces effets sont non monotones (Vandenberg et al. 2012) ce qui justifie l'étude des effets d'une exposition à des faibles doses de BPA et BPS dans notre modèle.

Introduction

Introduction

1. L'origine développementale de la santé et des pathologies (Developmental Origin of Health and Disease) (DOHaD)

Dans les années 1980, Barker et collaborateurs avaient observé que dans les régions de Grande-Bretagne où la mortalité néonatale et infantile était élevée, il existait également un taux important de mortalité d'origine cardiovasculaire 50 années plus tard (Barker 1998). Sur base de ces données, les chercheurs ont étudié au niveau individuel la relation possible entre des événements survenant à la naissance et à l'âge adulte. De multiples cohortes ont ainsi mis en évidence une corrélation négative entre un faible poids à la naissance et le risque de développer des pathologies cardio-vasculaires à l'âge adulte (Barker 1998).

Un autre exemple de l'influence de l'environnement périnatal sur la santé au long cours est illustré par le suivi des individus nés pendant la famine qui a eu lieu aux Pays-Bas lors de la 2^{ème} guerre mondiale. Lorsqu'on étudie le devenir des individus nés avant, pendant et après la période de famine, les individus qui ont été exposés *in utero* à la famine présentent à l'âge adulte une incidence plus élevée de mortalité ou de morbidité cardiovasculaire et de résistance à l'insuline (Roseboom et al. 2001).

C'est ainsi qu'est née l'hypothèse de l'origine fœtale / développementale de la santé et des pathologies (DOHaD), communément appelée l'hypothèse de Barker. Elle suppose qu'une malnutrition maternelle ou fœtale à certaines périodes clés de la grossesse peut entraîner une restriction de croissance reflétant un mécanisme de protection du fœtus afin de préserver l'apport en énergie au niveau des organes vitaux comme le cerveau aux dépens d'organes comme le foie, le pancréas, les reins et les muscles (Hales and Barker 1992). Ces adaptations prédisposeraient l'individu à une susceptibilité accrue à développer des maladies chroniques à l'âge adulte.

Par la suite, d'autres observations ont corroboré cette hypothèse, en lien avec d'autres conditions fœtales qu'un faible poids de naissance. Les enfants nés d'une mère qui présente un diabète gestationnel ont par exemple un poids de naissance plus élevé et sont plus susceptibles de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte (Fall and Kumaran 2019). Il existe à l'heure actuelle de nombreux exemples dans la littérature concernant les effets au long cours de l'exposition développementale à d'autres facteurs environnementaux (stress psychosocial, facteurs infectieux, ...) (Cao-Lei et al. 2020).

Le concept de DOHaD peut tout à fait se transposer au domaine de la perturbation endocrinienne puisqu'il apparaît qu'une exposition *in utero* ou durant la vie postnatale précoce à des PE peut avoir un impact sur la santé de l'individu tout au long de sa vie. Cela sera illustré dans le sous-chapitre consacré aux effets perturbateurs endocriniens du BPA et du BPS dans lequel nous reprendrons de façon exhaustive les données humaines et animales rapportant les effets d'une exposition précoce au BPA et au BPS sur le contrôle de la croissance fœtale et postnatale et de la reproduction (timing pubertaire).

D'un point de vue mécanistique, des modifications épigénétiques pourraient expliquer cette programmation précoce de la santé d'un individu sous l'influence de facteurs environnementaux. Nous reviendrons plus en détail sur les mécanismes épigénétiques et leur implication possible dans la programmation précoce de la santé de l'individu dans le chapitre 3 de cette introduction.

2. Les perturbateurs endocriniens : principes généraux

2.1 Définition d'un perturbateur endocrinien

C'est en 1991, lors de la conférence de Wingspread, que des experts scientifiques ont introduit la problématique de la perturbation endocrinienne. Ces derniers ont conclu que « de nombreux composés introduits dans l'environnement

par l'activité humaine sont capables d'altérer le système endocrinien des animaux et celui des humains. La perturbation peut porter sur des aspects essentiels de la santé à cause du rôle crucial que jouent les hormones dans le contrôle du développement. » (Hotchkiss et al. 2008).

Depuis, les données scientifiques concernant les effets possibles de ces composés sur la santé humaine ne cessent de s'accumuler. Cependant, la définition même de ce qu'est un PE reste débattue étant donné les enjeux pour l'industrie chimique autant que pour les groupes défendant la santé publique et l'intégrité de l'environnement.

A l'heure actuelle, la définition la plus communément admise d'un PE est celle proposée par l'OMS en 2002 qui définit un PE comme « ... *une substance exogène ou un mélange qui altère une ou des fonctions du système endocrinien et par conséquent induit des effets négatifs dans un organisme intact, ou sa descendance, ou des (sous-) populations* » (WHO 2002). Il s'agit également de la définition retenue par la commission européenne (Munn and Goumenou 2013). L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) utilise plutôt le terme de substances actives sur le système endocrinien (SASE) pour décrire « toute substance chimique qui peut interagir ou interférer avec le système endocrinien et par conséquent entraîner un effet sur le système endocrinien, des organes cibles ou des tissus ».

La définition donnée par l'Endocrine Society en 2012 est plus élémentaire puisqu'elle définit un PE comme « ... *une substance exogène ou un mélange qui interfère avec n'importe quel aspect de l'action hormonale* » (Zoeller et al. 2012).

Plusieurs milliers de substances peuvent répondre aux critères de définition des PEs. Le tableau I reprend quelques PEs en fonction de leur origine et de leur fonction. La plupart de ces substances sont des composés synthétiques, à l'exception des phyto-oestrogènes qui sont des composés naturels d'origine

végétale. On retrouve aussi des produits pharmaceutiques comme les contraceptifs oraux, avec la particularité pour ces derniers que c'est leur propriété de perturbation endocrinienne qui est recherchée.

Tableau I : exemples de PE en fonction de leur origine et de leur fonction (Fudvoye et al. 2014b)

Origine	Fonction	Composés
Industrie	Incinération, isolation	Dioxines, biphényles polychlorés (PCBs)
	Surfactants, agents nettoyants	Alkylphénols, tributylétain
Agriculture	Pesticides organochlorés, Insecticides	DDT, méthoxychlor, dieldrine, lindane, chlordécone
	Herbicides, Fongicides	Atrazine, Vinclozoline
	Phyto-oestrogènes, (naturels)	Génistéine, Coumestrol
Usage domestique	Plastifiants	Phtalates
	Résines, matières plastiques	Bisphénol A (BPA)
	Retardateurs de flamme	Biphényles polybromés (PBBs)
	Cosmétiques	Parabènes
	Contraceptives	Oestrogènes synthétiques, Diéthylstilbestrol

L'exposition humaine aux PEs se fait principalement par voie orale à travers la consommation d'aliments ou d'eau contaminés (passage du BPA ou des phtalates provenant des emballages des aliments ou des boissons). Elle peut aussi se faire par voie transdermique (application de produits cosmétiques contenant des parabènes) ou par inhalation (Gore et al. 2015). Enfin, le fœtus ou le jeune enfant peuvent être exposés aux PEs respectivement après un passage transplacentaire ou dans le lait maternel.

Certains PEs sont des composés lipophiles qui peuvent s'accumuler dans le tissu adipeux au sein de l'organisme et ainsi entraîner une exposition prolongée de l'individu (par exemple les pesticides organochlorés). A l'inverse, d'autres substances, comme le BPA, ont des demi-vies très courtes et sont excrétées dans l'urine sans qu'il n'y ait une accumulation au sein de l'organisme mais l'exposition au quotidien à ces substances justifie les inquiétudes par rapport à leurs potentiels effets sur la santé (Calafat et al. 2008).

2.2 Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

Par définition, les PEs peuvent interagir à tous les niveaux de signalisation du système hormonal (La Merrill et al. 2020).

Le mécanisme d'action le mieux défini concernant les PEs est leur interaction avec les récepteurs hormonaux. En effet, étant donné leur similarité de structure tertiaire avec les hormones, les PEs peuvent agir en tant qu'agonistes des récepteurs hormonaux : ils se fixent sur le récepteur naturel de l'hormone à sa place et miment son action (agonistes oestrogéniques, agonistes des récepteurs PPAR- γ) ou antagonistes des récepteurs hormonaux: ils se fixent sur le récepteur et bloquent son action (antagonistes androgéniques, antagonistes des hormones thyroïdiennes). Les PEs peuvent aussi interagir avec le récepteur d'aryl hydrocarbure (AhR), qui est activé par des polluants organiques persistants et qui

régule la transcription des gènes de la même manière que les récepteurs nucléaires (Diamanti-Kandarakis et al. 2009; Swedenborg et al. 2009).

Les PEs peuvent aussi médier leurs effets en amont des récepteurs hormonaux : ils sont capables d'altérer la synthèse, le transport ou la métabolisation des hormones et ainsi modifier la concentration de ces dernières dans l'organisme (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

Enfin, les PEs peuvent modifier l'expression des récepteurs hormonaux, en induisant la dégradation de ces derniers par le complexe protéasome-ubiquitine (Swedenborg et al. 2009).

En aval des récepteurs hormonaux, les PEs peuvent influencer la signalisation intracellulaire et les mécanismes de rétrocontrôle ou d'effets en cascade, notamment en interagissant avec les coactivateurs ou les corépresseurs des récepteurs hormonaux (Swedenborg et al. 2009; Zhang et al. 2018).

Contrairement aux hormones endogènes qui bénéficient d'un récepteur qui leur est spécifique, les PEs interagissent généralement avec différents récepteurs hormonaux avec une affinité variable. Un exemple de cette action multiple est celui du BPA qui peut agir comme un agoniste des récepteurs aux oestrogènes (ER alpha et beta) (Wetherill et al. 2007) mais aussi interagir avec d'autres types de récepteurs tels que les récepteurs transmembranaires aux oestrogènes (récepteur aux oestrogènes couplés aux protéines G, GPR30) (Qie et al. 2021) ou d'autres récepteurs nucléaires comme les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, les récepteurs aux androgènes et les récepteurs aux glucocorticoïdes (Prasanth et al, 2010 ; Sun et al. 2006 ; Zoeller et al. 2005). Le mode d'action précis du BPA sera rediscuté plus en détails dans le chapitre 2.5.3 de cette introduction.

En parallèle à leur action sur le système hormonal, il apparait que les PEs peuvent avoir un impact sur l'expression des gènes en induisant des modifications épigénétiques. Ces dernières, lorsqu'elles surviennent dans les gamètes, peuvent

expliquer les effets transgénérationnels de l'exposition aux perturbateurs endocriniens (Skinner 2011). Les mécanismes épigénétiques seront abordés plus en détails dans le chapitre 3 de cette introduction, en particulier les modifications épigénétiques induites par l'exposition au BPA et au BPS.

2.3 Effets non monotones et effets à faibles doses

La notion de dose est fondamentale en toxicologie. Le principe classique appliqué pour la définition d'une dose toxique est le suivant : « *c'est la dose qui fait le poison* ». Autrement dit, en dessous d'un certain seuil d'exposition, il ne va pas y avoir d'effet mais des effets seront observés aux doses supérieures. L'application de ce principe implique qu'il y a une relation linéaire entre l'exposition à une substance et ses effets : plus la dose sera élevée et plus grand sera l'effet (Figure 1).

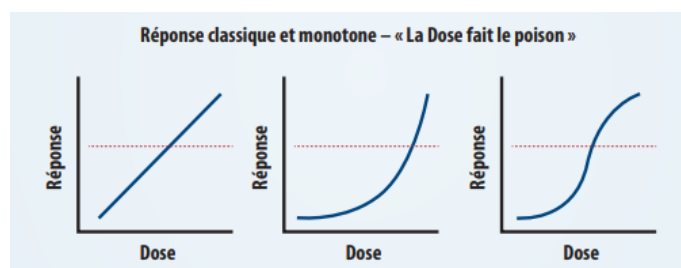


Figure 1 : relation dose réponse classique et monotone : « la dose fait le poison » (Flaws et al. 2020)

Classiquement, après avoir établi la relation linéaire dose/réponse pour une substance, on définit une NOAEL (no observed adverse effect level) et/ou une LOAEL (lowest observable adverse effect level). La NOAEL est la dose en dessous de laquelle une substance ne doit pas induire d'effets néfastes, quelle que soit la dose tandis que la LOAEL est la dose minimale entraînant un effet nocif observé (Slob et Pieters 1998). Après application d'un facteur de correction, en général de 3 à 1 000, pour tenir compte des variations individuelles, on définit une dose de référence (dose de sécurité) pour une substance donnée. L'exposition humaine correspond

souvent à des doses inférieures à cette dernière. Les doses définies pour chaque substance sont donc la plupart du temps extrapolées à partir des données récoltées sur les hautes doses (Figure 2).

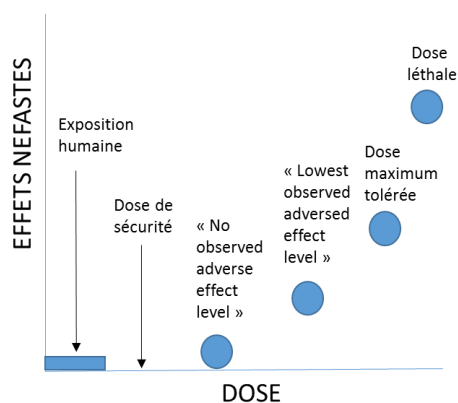


Figure 2 : définition des différentes doses pour une substance donnée à partir d'une courbe dose réponse linéaire (adaptée de Hill et Vandenberg 2018)

Ce principe de dose seuil n'est cependant pas applicable en endocrinologie et de la même manière dans le domaine de la perturbation endocrinienne. Par rapport au système endocrinien, si l'on prend l'exemple du niveau d'hormones thyroïdiennes pendant la grossesse, comme illustré dans la figure 3, il faut un certain taux d'hormones thyroïdiennes maternelles pour qu'il n'y ait pas de troubles neuro-développementaux chez l'enfant. Une hypothyroïdie mais aussi une hyperthyroïdie maternelle auront des effets néfastes sur le devenir neuro-développemental de l'enfant. On définit donc en quelque sorte une « gamme » de doses physiologiques.

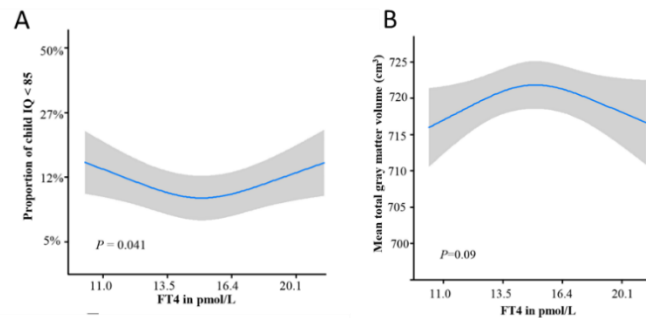


Figure 3 : Relation entre les concentrations maternelles en hormones thyroïdiennes pendant la grossesse et (A) la proportion d'enfants ayant un quotient intellectuel à l'âge de 6-8 ans inférieur à 85 points et (B) le volume du cortex des enfants à l'âge de 8 ans (Korevaar et al. 2016)

C'est un principe similaire qui s'applique lorsqu'on essaie de définir une relation dose-effet pour les perturbateurs endocriniens : il a été démontré que des faibles doses peuvent avoir un impact plus élevé que des doses moyennes voire élevées (Vandenberg et al. 2012). Ce type de réponse donne lieu à des courbes dose-réponse en U ou en U inversé (Figure 4). Ces courbes sont considérées comme non monotones car la pente de ces courbes change au moins une fois de signe dans la gamme de concentrations étudiées.

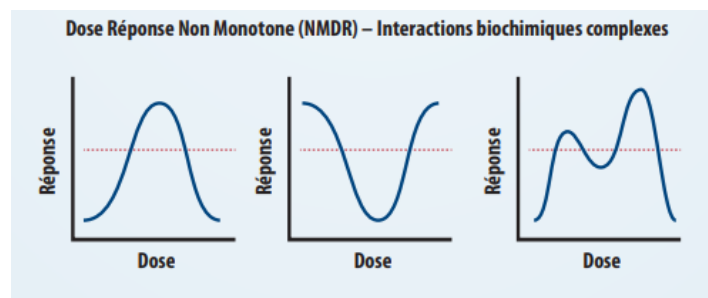


Figure 4 : Relation dose réponse non monotone (Flaws et al. 2020)

Pour certaines substances, la courbe dose réponse non monotone se situe entre la dose de référence et la NOAEL (Figure 5A). Des effets sont donc observés à des doses supérieures à la dose de référence définie mais inférieures à la NOAEL. La

courbe dose réponse non monotone peut également se situer en dessous de la dose de référence (Figure 5B), ce qui remet en cause la réelle valeur sécuritaire de cette dose de référence pour la population humaine. C'est le cas pour de nombreuses études épidémiologiques menées chez l'humain dans le domaine de la perturbation endocrinienne (Vandenberg et al. 2012) avec des effets sur la santé observés après exposition à des doses environnementales, souvent considérées comme en dessous de la dose de référence. Non seulement ce type de réponse peut être ignoré par les méthodes de test conventionnelles mais en plus cela pose la question du bien fondé de définir une dose de référence sur base d'extrapolation à partir de la NOAEL.

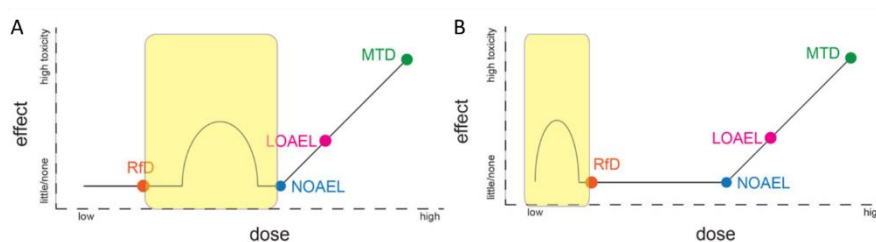


Figure 5 : Exemples illustrant des courbes dose-réponse non monotones se situant dans différentes parties de la courbe dose-réponse. (A) la courbe dose réponse non monotone est située entre la dose de référence (RfD) et la NOAEL. (B) la courbe dose réponse non monotone est située en dessous de la dose de référence. (Hill et al. 2018)

Ces deux exemples montrent que l'existence de relations dose réponse non monotones pour les faibles doses rend complexe la définition d'une dose « de sécurité » pour un PE défini. Cela illustre également la nécessité de tester un grand nombre de doses pour définir les courbes dose réponse d'une substance donnée et l'intérêt d'utiliser les effets néfastes sur la santé observés à faibles doses et non à hautes doses pour calculer les doses de référence considérées comme sans risque pour la population humaine (Hill et al. 2018).

Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer les courbes dose réponse non monotones caractéristiques de certains PE. Un premier mécanisme possible est la cytotoxicité. En effet, à doses élevées, certains PE peuvent entraîner des effets toxiques qui inhibent la réponse attendue malgré l'augmentation de la dose. Comme déjà discuté, un seul PE peut avoir plusieurs cibles moléculaires et en l'occurrence interagir avec plusieurs récepteurs hormonaux. A très faibles doses, ils vont agir sur les récepteurs pour lesquels ils ont une haute affinité tandis qu'à plus fortes doses, ils vont aussi se fixer sur des récepteurs pour lesquels ils ont moins d'affinité mais qui induiront peut être une réponse opposée. C'est aussi cela qui explique les effets potentiellement différents entre deux tissus en fonction du profil d'expression des récepteurs au sein de ces derniers. Par ailleurs, les effets non monotones peuvent être expliqués par les modifications d'expression et/ou d'activités des récepteurs. En effet, une fois activés et le signal en aval transmis, les récepteurs sont dégradés ou inactivés ce qui constitue une désensibilisation. Une diminution de l'expression est également observée lorsque la concentration d'une hormone augmente afin de maintenir une réponse constante. Les PE peuvent aussi engendrer des effets à faibles doses en fonction de leur métabolisation : à faible dose, un PE peut être transformé en un métabolite actif et induire ses effets tandis qu'à fortes doses, le système de métabolisation peut être saturé et ainsi diminuer l'effet observé.

2.4 Fenêtre de vulnérabilité par rapport à l'exposition aux perturbateurs endocriniens

Les hormones jouent un rôle fondamental dans le développement de l'organisme, notamment durant la vie intra-utérine. Un exemple du rôle crucial que jouent les hormones durant cette période critique du développement est l'influence des hormones thyroïdiennes sur le développement du cerveau du fœtus (Pemberton et al. 2005) ou encore le rôle des stéroïdes sexuels dans la régulation de la différenciation sexuelle du fœtus (Rey and Picard 1998). Les effets de ces

hormones étant obtenus à des concentrations très faibles, une perturbation même minimale de ces dernières peut avoir un impact important sur le fœtus. En parallèle au rôle qu'elles jouent dans le développement de certains organes, les hormones contrôlent également la mise en place de processus homéostatiques qui vont réguler le fonctionnement de l'organisme tout au long de la vie, notamment par rapport au contrôle de la balance énergétique et de la reproduction. En interférant avec les processus homéostatiques mis en place durant ces périodes critiques de développement, l'exposition précoce aux PEs peut avoir des conséquences à long terme sur la santé de l'individu, ce qui sous-tend le concept de l'origine développementale des pathologies de l'adulte (Hanson and Gluckman 2011) que nous avons abordé dans le chapitre 1 de cette introduction.

L'exposition du fœtus et du nouveau-né aux PEs se fait via le passage transplacentaire des PEs d'origine maternelle ou via le lait maternel. La femme enceinte est exposée à un grand nombre de PEs puisque 36 composés ont été détectés dans les urines de plus de 50% de femmes enceintes aux Etats-Unis (3 benzophénones, 2 bisphénols, 4 fongicides et herbicides, 3 insecticides, 2 organophosphates, 3 parabènes, 16 phtalates/plastifiants alternatifs) (Buckley et al. 2022). Les PEs sont également détectés dans le sérum et le liquide amniotique des femmes enceintes (Maitre et al. 2018). Or, le placenta ne constitue pas une barrière de protection du fœtus puisque ces derniers traversent le placenta comme l'a confirmé la comparaison des concentrations dans le sérum et l'urine maternels avec celle du liquide amniotique, du sang de cordon et du méconium (Barr et al. 2007). Le passage transplacentaire de certaines substances comme le BPA est illustré par les concentrations quasi équivalentes dans le sang maternel et le sang de cordon (Pan et al. 2020). D'autres études ont même retrouvé des quantités équivalentes voir plus élevées de BPA chez le fœtus (Vandenberg et al. 2007).

C'est aussi durant la vie intra-utérine que la génération future est exposée aux PEs via l'action de ces derniers sur les cellules germinales du fœtus. Ces dernières

subissent en effet des vagues de déméthylation successives puis de reméthylation avec lesquelles peuvent interférer les PE (Smallwood and Kelsey 2012). Cela sera abordé de façon plus précise dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

L'allaitement maternel constitue une autre voie d'exposition du nouveau-né aux PE puisque le lait maternel peut contenir diverses substances, en particulier les polluants persistants liposolubles (Stefanidou et al. 2009; Grandjean and Jensen 2004).

En plus de leur grande dépendance par rapport au climat hormonal dans lequel ils évoluent, le nouveau-né et le jeune enfant constituent également une population particulièrement sensible aux effets de l'exposition aux PE en raison du fait que leurs voies de métabolisation des substances sont encore immatures (Hakkola et al. 1998). D'autre part, leur alimentation est riche en pesticides (Boon et al. 2008) et leur comportement de jeux fait qu'ils portent régulièrement des objets en bouche (Selevan et al. 2000) ce qui peut contribuer à une exposition plus importante.

2.5 Bisphénol A et Bisphénol S

2.5.1 *Origine du BPA et du BPS et exposition*

Le BPA est un composé chimique phénolique synthétisé pour la première fois en 1891. Le BPA est obtenu par réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone (Figure 6). Il se présente sous la forme d'un solide blanc, en poudre, écailles ou cristaux, peu soluble dans l'eau et chimiquement stable (INRS 2022).

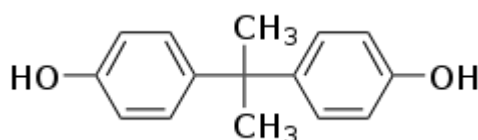


Figure 6 : Structure chimique du Bisphénol A

Le BPA est utilisé couramment pour la fabrication industrielle de plastiques polycarbonates que l'on retrouve dans de nombreux objets de la vie quotidienne tels que les bouteilles en plastique, les récipients destinés au four micro-ondes, les boîtes pour la conservation des aliments, des jouets en plastique,... Il intervient également dans la production de résines « époxy » qui tapissent l'intérieur des boîtes de conserve, des canettes ou les couvercles métalliques. En Europe, son utilisation dans la fabrication de biberons a été interdite en 2011 tandis que son usage comme révélateur pour l'impression des papiers thermiques, communément utilisés dans les caisses enregistreuses, a été banni en janvier 2020. Le BPA est également retrouvé dans les composites dentaires, plus précisément dans la matrice organique mais également dans les scellements des sillons (ce sont des résines utilisées comme traitement prophylactique des caries) (Vandenberg et al. 2007).

Son utilisation à des fins commerciales a commencé dans les années 1950 aux Etats Unis puis quelques années plus tard en Europe et sa production annuelle globale n'a cessé de croître (de 5 à 8 milliards de tonnes par an entre 2010 et 2016) avec une production estimée à 10.2 milliards de tonnes en 2022 (Research and Markets 2016 ; Staples et al. 2018). Le BPA est donc très largement répandu dans notre environnement et cela est confirmé par la détection de BPA dans les urines de plus de 93% de la population aux Etats Unis (Calafat et al. 2005; Calafat et al. 2008). Le BPA est également présent dans les urines de plus de 95% de la population en Belgique (Pirard et al. 2012). Plusieurs études ont par ailleurs démontré la présence de BPA au sein du placenta et du liquide amniotique (Schönfelder et al. 2002; Edlow et al. 2012; Engel et al. 2006; Ikezuki et al. 2002; Yamada et al. 2002) reflétant l'exposition du fœtus à cette substance.

L'exposition humaine au BPA se fait principalement par voie orale. En effet, les molécules de BPA sont liées au reste de l'objet via des liaisons ester sensibles à

l'hydrolyse. Cette hydrolyse est accélérée par la chaleur ou au contact de substances basiques ou acides. Ainsi, au contact d'un produit acide (par exemple un soda) ou lorsqu'un récipient est réchauffé au four à micro-onde, le BPA peut migrer dans le contenu et le contaminer (Goodson et al. 2004). La consommation de nourriture et/ou boissons « en boîte » constitue donc la principale source d'exposition humaine au BPA (Geens et al. 2012). Cela est confirmé par l'augmentation des taux urinaires de BPA chez les personnes ayant consommé une soupe en boîte comparés aux personnes ayant consommé une soupe fraîche (Carwile et al. 2011). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que des changements dans les habitudes alimentaires (éviction des aliments en conserve ou emballés) permettaient de réduire drastiquement les taux urinaires de BPA (Rudel et al. 2011).

En parallèle à l'exposition par voie orale, l'exposition humaine au BPA peut se faire par voie transdermique. Même si le taux de diffusion du BPA à travers la barrière cutanée est moins étudié, une étude a révélé une augmentation des taux sanguins et urinaires de BPA chez des personnes volontaires tenant dans leur main des tickets de caisse (Hormann et al. 2014). Par ailleurs, des taux de BPA plus élevés ont été observés dans les urines des caissiers (Ehrlich et al. 2014). Dans une moindre mesure, un contact direct cutané avec l'air, les poussières ou l'eau contaminée par le BPA peut aussi constituer une source d'exposition humaine au BPA (Zalko et al. 2011).

Une autre source potentielle d'exposition humaine au BPA est la libération de BPA à partir de résines dentaires pouvant contenir de faibles doses de BPA (Van Landuyt et al. 2011). Dans une moindre mesure, l'exposition humaine au BPA peut aussi se faire via du matériel médical de perfusion (voie intraveineuse), un portage à la bouche de jouets en plastique chez les jeunes enfants, l'utilisation de détergents ménagers ou de produits cosmétiques contenant du BPA (Vandenberg

et al. 2013b). Enfin, l'inhalation de poussières contenant du BPA constitue une dernière voie d'exposition possible (Calafat et al. 2008).

L'estimation précise de l'exposition humaine au BPA reste encore à l'heure actuelle un sujet de débat et en particulier la question de savoir si les niveaux d'exposition sont suffisants pour justifier des inquiétudes par rapport aux potentiels effets néfastes du BPA sur la santé. Même si les effets à faibles doses du BPA ont été clairement décrits (Vandenberg et al. 2013a), certaines agences de protection de l'environnement considèrent encore que le niveau d'exposition au BPA est sans danger. L'article de synthèse de Vom Saal et Vandenberg (vom Saal and Vandenberg 2020) décrit largement les spécificités inhérentes au BPA qui doivent être prises en compte dans l'évaluation du risque sanitaire.

De façon classique, l'exposition au BPA est estimée sur base de la détection du BPA et de ses métabolites (BPA-glucuronide et BPA-sulfate) dans les urines de la population (Vandenberg et al. 2010). En effet, une fois métabolisé, le BPA est rapidement excrété dans les urines (Dekant and Völkel 2008), raison pour laquelle le niveau d'excrétion du BPA dans les urines de 24h constitue un bon indicateur de la dose journalière de BPA auquel l'individu a été exposé (Lakind and Naiman 2008). L'exposition journalière au BPA a été estimée de l'ordre de 7 à 65 ng/kg/j pour l'adulte et de 15 à 200 ng/kg/j pour l'enfant (Huang et al. 2017). Chez les femmes enceintes, on estime cette dernière de l'ordre de 20 à 150 ng/kg/jour (Huang et al. 2017). En Belgique, le BPA a été détecté dans les urines de 86% d'une population d'adolescents flamands âgés en moyenne de 14.8 ans avec une concentration moyenne estimée de 1.05 µg/L (Gys et al. 2021). Cette dernière est en diminution par rapport à celle mesurée sur une population semblable entre 2008 et 2009 (2.56µg/L) (Geens et al. 2014). Le taux de détection du BPA élevé est en accord avec les autres études réalisées chez les enfants et les adolescents dans d'autres pays comme la Chine, les Etats-Unis, le Canada ou le Brésil (Chen et al. 2018; Lehmler et al. 2018; La Rocha et al. 2018; LaKind et al. 2019). En Europe, sur base des données

provenant d'enfants âgés entre 5 et 12 ans, les taux urinaires de BPA étaient en moyenne de 2.04 µg/l. Les taux urinaires de BPA étaient un peu moins élevés chez leur maman (1.88 µg/L). Il existait une corrélation positive entre les concentrations urinaires en BPA chez l'enfant et leur maman (Covaci et al. 2015).

Plusieurs études ont également évalué les taux urinaires de BPA chez les femmes enceintes étant donné la grande sensibilité du fœtus par rapport à l'exposition aux PEs : dans une étude réalisée au Canada, 88% des femmes enceintes avaient des taux détectables de BPA dans leur urine avec une concentration moyenne estimée 0.8 µg/L (Arbuckle et al. 2014). Certaines études essaient de corréler les taux urinaires de BPA durant la grossesse avec les habitudes alimentaires de la femme enceinte afin de définir des facteurs prédictifs de l'exposition au BPA et ainsi pouvoir formuler des recommandations notamment diététiques afin de limiter l'exposition aux PEs pendant la grossesse, comme par exemple limiter la consommation d'aliments provenant de boîtes de conserve ou contenus dans des emballages plastiques (Pacyga et al. 2019). Même si la majorité des études publiées se concentrent sur les effets de l'exposition du fœtus au BPA suite à l'exposition de la mère pendant la grossesse, il ne faut pas négliger l'influence possible de l'exposition du père au BPA. En effet, plusieurs études ont montré que l'exposition au BPA était associée à des altérations protéiques et épigénétiques dans les cellules du sperme (Bisconti et al. 2021; Kiwitt-Cárdenas et al. 2021; Ryu et al. 2022; Song et al. 2019). Or, lors de la conception, les spermatozoïdes délivrent non seulement l'ADN qui formera 50% du génome du fœtus mais aussi des marques de l'épigénome ainsi que de l'ARN ou des protéines spécifiques du père. Des altérations de ces derniers résultant de l'exposition antérieure du père peuvent donc être transmises à sa descendance. Il apparaît donc important que les recommandations visant à limiter l'exposition aux PEs puissent être également discutées avec le père lors de la planification d'une grossesse.

Même si les données récoltées au sein de larges cohortes nationales concernant l'exposition de la population au BPA constituent une source importante d'informations (évolution de l'exposition au cours du temps, différences d'exposition entre pays ou au sein de certaines sous-populations), il ne faut pas sous-estimer les différences méthodologiques et autres facteurs qui peuvent influencer la mesure des concentrations urinaires en BPA (par exemple, le temps de jeûne avant un prélèvement) (LaKind et al. 2019). Pour faire face à ces limitations, le projet européen « HBM4EU » a pour but de coordonner et de centraliser les données concernant l'exposition humaine au BPA et à d'autres substances au sein de 30 pays européens (Weise et al. 2022).

Initialement, l'agence de protection environnementale américaine (EPA) et l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) avaient établi une dose journalière sans risque pour la santé de 50 µg/kg/j (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). La dose « de sécurité » estimée est calculée sur base du principe qu'une dose 1000 fois plus basse que la LOAEL (fixée à 50000 µg/kg/j pour le BPA) ne devrait pas avoir d'effets si on y est exposé par voie orale quotidiennement au cours de la vie (EPA/IRIS 1988). Au vu des nouvelles données scientifiques, dans son évaluation des risques associés au BPA de 2015, l'EFSA avait revu cette dose à la baisse et l'avait fixée à 4 µg/kg/j (EFSA Panel on Food Contact Materials 2015). Lors des nouvelles évaluations mandatées par l'EFSA, un groupe d'experts a préconisé un abaissement de la dose journalière tolérable à 0.04 ng/kg/j au vu des dernières données de la littérature et en particulier des effets décrits du BPA sur le système immunitaire (Ménard et al. 2014). Cependant, à l'heure actuelle, la dose de 4 µg/kg/j est toujours considérée comme la dose seuil de sécurité. Même si l'exposition journalière de la population au BPA est estimée comme plus faible, cela ne signifie pas l'absence de risque pour la population au vu des caractéristiques spécifiques du BPA, et en particulier de ses effets à très faibles doses.

Même si la mesure des concentrations urinaires de BPA pour évaluer l'exposition humaine est admise par la plupart des scientifiques, certains groupes d'experts, en association avec la FDA (Food and Drug Administration), considère la mesure des taux sanguins de BPA non conjugué (forme libre active) comme un meilleur reflet de l'exposition au BPA et de ses potentiels effets néfastes (Doerge et al. 2010; Goodman et al. 2006). Etant donné la métabolisation rapide du BPA, il est difficile de mesurer des taux détectables de BPA libre dans le sérum. Cet argument a été utilisé pour renforcer l'idée selon laquelle le BPA était inoffensif. Les auteurs se sont basés sur des études animales évaluant la biodisponibilité du BPA après administration par gavage une seule fois par jour. Cependant, le gavage ne constitue pas un bon reflet de l'exposition humaine au BPA puisqu'il est associé à une très faible biodisponibilité (Vandenberg et al. 2014).

Malgré ces arguments qui tendent à sous-estimer les effets du BPA sur la santé, des restrictions concernant son utilisation dans de nombreux pays ont amené les industriels à progressivement remplacer le BPA par des analogues structuraux, dont fait partie le BPS (Figure 7).

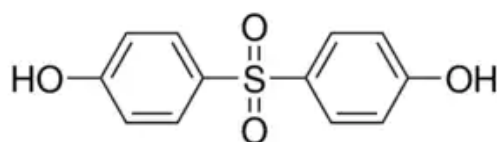


Figure 7 : structure chimique du Bisphénol S

Le BPS est aujourd'hui présent dans de nombreux matériaux, notamment les contenants alimentaires, les papiers thermiques, les résines dentaires ou encore des produits cosmétiques (Rochester and Bolden 2015). Le BPS est particulièrement utilisé pour la composition des papiers thermiques comme en témoigne sa présence dans 95.3% ; 90.9% et 51.1% des échantillons de papier thermique respectivement en Espagne, au Brésil et en France (Molina-Molina et al. 2019). Une

autre étude avait détecté du BPS dans 100% des échantillons de papier thermique aux Etats-Unis, au Japon, en Corée et au Vietnam (Liao et al. 2012). Comme pour le BPA, l'exposition au BPS se fait via l'alimentation, par voie transdermique et/ou par inhalation (Wu et al. 2018). Le BPS est détecté dans les urines de 81% de la population de 7 pays asiatiques (Liao et al. 2012) et de 89.4% de la population américaine (enfants et adultes) (Lehmler et al. 2018). Il est par ailleurs présent dans les urines de 67.8% d'une large cohorte (n= 1396) de femmes enceintes aux Pays-Bas (Philips et al. 2018). Le BPS a par ailleurs été détecté dans le sang de cordon (Liu et al. 2017; Zhang et al. 2020) ce qui suggère son passage transplacentaire.

2.5.2 Biodisponibilité du BPA et du BPS

Chez l'humain et chez le rongeur, après une exposition orale, l'absorption gastro-intestinale du BPA est totale et rapide (Doerge et al. 2010; Tsukioka et al. 2003; Völkel et al. 2005). Il se distribue alors dans tout l'organisme. Lors du premier passage entéro-hépatique, le BPA est rapidement transformé sous sa forme conjuguée inactive en BPA-glucuronide, grâce à l'action des uridine diphosphoglucuronosyltransferases (UGT) (Völkel et al. 2005). Dans une moindre mesure, le BPA est transformé en BPA-sulfate grâce à l'intervention des sulfotransférases (SULT) (Michałowicz 2014). Ces métabolites inactivés sont alors rapidement excrétés dans l'urine avec une demi-vie estimée à 5.3 heures (Völkel et al. 2002). Au vu de cet important effet de premier passage hépatique après administration orale de BPA et sa clairance plasmatique rapide (Collet et al. 2015), on pourrait s'attendre à des concentrations plasmatiques très faibles de BPA sous sa forme non conjuguée (de l'ordre du picomole) (Gauderat et al. 2017; Teegarden et al. 2013). Ces caractéristiques toxico-cinétiques ont d'ailleurs souvent été utilisées par les agences de régulation pour nier tout effet chronique du BPA. Cependant, ces dernières ne tiennent pas compte de plusieurs paramètres avancés par d'autres études. Premièrement, même si la forme conjuguée du BPA n'a pas d'effet sur les récepteurs aux oestrogènes classiques (Matthews et al. 2001), des études *in vitro*

ont montré que les métabolites conjugués du BPA pourraient avoir des effets biologiques similaires (Boucher et al. 2015) ou différents (Viñas and Watson 2013) de ceux du BPA, ce qui justifie la prise en compte de l'exposition au BPA et à ses métabolites dans l'évaluation du risque environnemental. Deuxièmement, de nombreuses études ont retrouvé des taux non négligeables de BPA sous forme libre au niveau du sang de cordon, dans le liquide amniotique, au niveau du plasma ainsi que dans le sérum chez les adultes (Vandenberg et al. 2007). Par ailleurs, le BPA a également été détecté sous forme non conjuguée dans les urines (Vandenberg et al. 2010). Cela pourrait s'expliquer par un métabolisme incomplet ou par le court-circuitage de l'effet du premier passage hépatique. Cela peut aussi s'expliquer par l'intervention d'enzymes pouvant déconjuguer les formes conjuguées du BPA : la beta glucuronidase pour le BPA-glucuronide et l'estrone sulfatase pour le BPA-sulfate (Ginsberg and Rice 2009; Stowell et al. 2006).

Par ailleurs, même si les UGT sont exprimées au sein du foie du fœtus, ces dernières sont inactives ou ont une très faible activité jusqu'à après la naissance, chez l'homme (de Wildt et al. 1999) et chez le rat (Matsumoto et al. 2002), ce qui rend le fœtus particulièrement vulnérable à l'exposition à la forme libre non conjuguée du BPA. De plus, une étude a montré que la beta glucuronidase est exprimée dans le foie fœtal (Matsumoto et al. 2002).

De façon similaire au BPA, les études concernant la métabolisation du BPS suggèrent que le BPS est principalement métabolisé en BPS-glucuronide et en BPS-sulfate (Song et al. 2017; Waidyanatha et al. 2018). Il apparaît cependant que les métabolites conjugués du BPS peuvent induire des effets biologiques identiques à ceux induits par le BPS sous forme libre (Peillex et al. 2021). Plusieurs études ont décrit la toxicocinétique du BPS et du BPS-glucuronide après exposition systémique chez le rat, le mouton, le porcelet et l'humain (Grandin et al. 2017; Gayrard et al. 2019; 2020; Oh et al. 2018; Khmiri et al. 2020). L'une d'entre elles menée chez le porcelet suggère une plus grande biodisponibilité du BPS par rapport au BPA après

administration par gavage ainsi qu'une clairance plasmatique diminuée pour le BPS, avec comme résultante une exposition systémique au BPS après ingestion par voie orale environ 250 fois plus importante que celle du BPA (Gayraud et al. 2019). La distribution du BPS au sein de l'unité placentaire materno-fœtale a par ailleurs été étudiée dans un modèle de mouton (Grandin et al. 2018). Après administration intraveineuse, le BPS est principalement transformé en BPS-glucuronide au niveau du compartiment maternel puis éliminé dans les urines. Un très faible pourcentage du BPS est retrouvé chez le fœtus. Cependant, seulement 26% de la dose de BPS retrouvée dans le compartiment fœtal est rapidement éliminée par voie transplacentaire et la moitié de la dose environ est transformée en BPS-glucuronide par le fœtus. Le BPS-glucuronide reste rémanent dans le compartiment fœtal puisque son élimination requiert une hydrolyse et sa transformation en BPS sous forme libre pour pouvoir être éliminé par voie transplacentaire (Grandin et al. 2018). Cela met en lumière l'exposition fœtale au BPS en dépit d'un passage faible au niveau transplacentaire.

2.5.3 Mode d'action du BPA et du BPS

Le BPA, de par sa structure chimique semblable à celle des oestrogènes naturels, peut se fixer aux récepteurs aux oestrogènes (ER alpha et ER beta) (Kitamura et al. 2005). Ces derniers font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Une fois activés par leurs ligands spécifiques, ces derniers quittent le cytoplasme pour rejoindre le noyau et former des dimères qui vont interagir avec des séquences spécifiques de l'ADN (ERE, estrogen responsive elements) et ainsi moduler l'expression de gènes cibles. Il s'agit de la voie génomique des oestrogènes (voie plus lente). Le BPA peut aussi interagir avec d'autres récepteurs oestrogéniques, tels que les récepteurs membranaires aux oestrogènes (mER) ou le récepteur couplé aux protéines G GPR30 dont l'activation va aboutir à une cascade de transduction mettant en jeu des seconds messagers, tels que l'activation de MAP kinases, l'augmentation du calcium intracellulaire et l'accumulation d'AMP cyclique

(Micevych et al. 2015). Il s'agit de la voie non génomique, qui peut médier les effets rapides du BPA à très faibles doses (Watson et al. 2005; Thomas and Dong 2006; Villar-Pazos et al. 2017). Le BPA peut aussi interagir avec les corégulateurs des récepteurs aux oestrogènes, comme en témoigne une diminution de l'expression de SRC-1 au sein des testicules de rats après exposition périnatale au BPA (Salian et al. 2009). En parallèle à ses effets oestrogéniques, le BPA agit comme antagoniste du récepteur aux hormones thyroïdiennes (Zoeller et al. 2005), et a aussi une activité anti-androgénique (Sohoni and Sumpter 1998).

De façon similaire au BPA, le BPS agit comme agoniste oestrogénique en se liant aux récepteurs aux oestrogènes (récepteurs alpha et beta) (Yamasaki et al. 2004; Cano-Nicolau et al. 2016; Le Fol et al. 2017). Le BPS a aussi une activité anti-androgénique (Perera et al. 2017) et peut aussi interagir avec le récepteur des hormones thyroïdiennes (Lu et al. 2018).

2.5.4 Effets perturbateurs endocriniens du BPA et du BPS

Comme discuté dans le chapitre 1 de la présente introduction, les périodes fœtale et postnatale précoce apparaissent comme des périodes critiques par rapport aux effets de l'exposition à des facteurs environnementaux avec des conséquences au long cours sur la santé de l'individu. Avant de décrire en détail les effets perturbateurs endocriniens du BPA et du BPS, nous allons brièvement remettre en perspective le concept de l'origine développementale des pathologies et de la santé par rapport aux effets des PEs. La transposition du concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies au domaine de la perturbation endocrinienne repose en fait sur des observations qui ont eu lieu avant que l'hypothèse de Barker ne soit connue. En effet, dans les années 70, il avait été montré que les filles exposées in utero au DES, un composé oestrogénique administré aux femmes enceintes afin de prévenir les fausses couches, présentaient un risque accru d'adénocarcinome vaginal (Herbst et al. 1971). Par la

suite, d'autres études ont montré que plus de 95% des femmes exposées *in utero* au DES présentaient des anomalies telles que des malformations du tractus reproductif, une hypofertilité ou des maladies immunitaires (Hoover et al. 2011). Des anomalies du tractus reproducteur tels que des hypospades, micropénis et inflammations génito-urinaires ont été rapportées chez les hommes exposés (Bamigboye and Morris 2003; Schrager and Potter 2004). Plus récemment, il a été rapporté qu'une exposition précoce aux phtalates (composants plastiques), au Dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT) (un insecticide) ou encore au BPA pouvait être associée à des anomalies du contrôle de la reproduction et de la balance énergétique (Skakkebaek et al. 2001; Parent et al. 2003; Fudvoye et al. 2014).

Nous allons décrire dans ce sous-chapitre les effets de l'exposition au BPA et au BPS sur la santé qui illustrent leur implication possible dans le concept de l'origine développementale des pathologies. Nous reprendrons les données animales et humaines qui étudient les effets de l'exposition au BPA et au BPS durant les périodes fœtale et postnatale précoce. En ce qui concerne les effets sur la santé, nous reprendrons essentiellement les effets sur la croissance et la balance énergétique ainsi que sur le système reproducteur mâle et femelle. Les effets de l'exposition au BPA sur la santé globale ont été repris par Gore *et al* dans « EDC--2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine--Disrupting Chemicals » (Gore et al. 2015).

Même si la recherche épidémiologique de ces dernières années a mis en exergue la contribution de l'exposition développementale aux PE dans la survenue de nombreuses maladies, les études épidémiologiques menées chez l'humain font face à plusieurs facteurs limitants. Ces derniers sont repris dans le tableau II et ces facteurs entreront en ligne de compte lors de la discussion des effets rapportés de l'exposition précoce au BPA et au BPS chez l'humain.

Tableau II : Facteurs de difficultés dans la démonstration et la gestion de la perturbation endocrinienne chez l'humain (Fudvoye et al. 2014b)

- Rémanence variable dans l'organisme et l'environnement (DDE, PCBs,...)
- Latence très longue entre l'exposition et les effets
- Facteurs de sensibilité individuelle (périodes critiques du développement, polymorphisme génique, interaction avec « stressseurs » autres que chimiques)
- Effets variables selon la période d'exposition et la durée d'exposition
- Effets de mixtures à faibles doses
- Relation dose-réponse non conventionnelle, absence de seuil
- Mécanismes multiples, effets épigénétiques

En ce qui concerne le BPA, ce dernier se caractérise par sa demi-vie courte (< 6h) (Völkel et al. 2002), ce qui rend parfois difficile l'évaluation du vrai niveau d'exposition d'un individu. Il a été démontré que des modifications dans les habitudes de consommation pendant 3 jours entraînent une diminution des taux urinaires de BPA (Rudel et al. 2011). De plus, la concentration urinaire en BPA peut varier si le prélèvement est effectué à jeun ou non (Braun et al. 2011). Nous sommes par ailleurs exposés au quotidien non pas au BPA seul mais à un mélange complexe de substances, qui même si isolément sont inactives, peuvent ensemble avoir des effets non prédits par leur étude individuelle (Christiansen et al. 2009). Par ailleurs, les effets du BPA peuvent varier en fonction de la période d'exposition et de la durée de l'exposition. Ces difficultés justifient la recherche sur les modèles animaux afin d'étudier les mécanismes biologiques précis qui font le lien entre une exposition précoce et ses effets à long terme.

Effets du BPA et du BPS sur la croissance fœtale et postnatale

Les anomalies du développement fœtal peuvent avoir un impact significatif sur la santé publique, puisqu'elles sont associées à de nombreuses pathologies chez l'enfant (Miller et al. 2016) ou à l'âge adulte (Barker 2006). Etant donné le passage du BPA à travers la barrière placentaire et son accumulation au sein du liquide amniotique ou des tissus embryonnaires (Chou et al. 2011; Casas et al. 2013; Schönfelder et al. 2002), des études chez l'humain ont évalué les effets de l'exposition au BPA sur la croissance fœtale. Plusieurs études ont montré que l'exposition fœtale au BPA réduisait le poids de naissance (Zbucka-Krętownska et al. 2019; Pinney et al. 2017; Snijder et al. 2013; Huang et al. 2021; Troisi et al. 2014; Wang et al. 2017; Xu et al. 2015). Certaines études ont mis en évidence des effets différents selon le sexe : l'étude de Veiga Lopez *et al* (Veiga-Lopez et al. 2015) a rapporté un risque plus élevé de faible poids à la naissance chez les nouveau-nés filles tandis que l'étude de Chou *et al* (Chou et al. 2011) a elle rapporté un risque plus élevé de faible poids à la naissance chez les nouveau-nés garçons avec une exposition plus importante au BPA durant la grossesse. Il apparaît par ailleurs que le risque de présenter un faible poids de naissance est plus élevé lorsque que les taux urinaires maternels de BPA durant la période préconceptionnelle sont élevés (Mustieles et al. 2018). D'autres études n'ont cependant pas démontré de lien entre l'exposition fœtale au BPA et le poids ou la taille à la naissance (Woods et al. 2017; Aker et al. 2019; Huang et al. 2017; Padmanabhan et al. 2008; Tang et al. 2013; Ding et al. 2017; Dalkan et al. 2020; Philippat et al. 2019; 2014; Burstyn et al. 2013). Certaines études par contre, ont mis en évidence que l'exposition prénatale au BPA était associée à un poids de naissance plus élevé (Gounden et al. 2019). Il est à noter que dans cette cohorte d'Afrique du Sud, l'exposition prénatale au BPA était attestée par la mesure des concentrations en BPA au niveau du sang de cordon, et que le BPA était détecté dans seulement 25% des échantillons collectés

soit un n de 24. Une autre étude réalisée sur une plus large cohorte coréenne ($n=757$ participants) a cependant établi la même corrélation positive entre l'exposition prénatale au BPA (évaluée par les concentrations urinaires en BPA au 3^{ème} trimestre de la grossesse) et le poids de naissance et ce de façon plus significative chez les nouveau-nés garçons (Lee et al. 2014). Dans cette même cohorte, le poids de naissance était plus élevé chez les garçons ayant des concentrations urinaires en BPA plus hautes (Lee et al. 2018). D'autres études ont également évalué le lien entre l'exposition prénatale au BPA et l'évolution des paramètres de croissance fœtale mesurés par échographie. Comme pour le poids à la naissance, les résultats sont nuancés : certaines études n'ont pas montré d'association entre l'exposition prénatale au BPA et les paramètres de croissance fœtale (Casas et al. 2016; Ferguson et al. 2016; Philippat et al. 2014). L'étude d'une cohorte de femmes enceintes coréennes a par contre démontré que l'exposition au BPA entraînait une restriction de croissance (évaluée sur base du périmètre abdominal, de la longueur du fémur et du périmètre crânien) chez le fœtus (Lee et al. 2018). De façon intéressante, dans l'étude de Snijder *et al*, l'évolution de la croissance en ce qui concerne le poids fœtal et le périmètre crânien était diminuée chez les fœtus avec une exposition au BPA plus élevée lorsque cette dernière était évaluée sur base de 3 échantillons récoltés pendant la grossesse. Cette association avait tendance à s'amender lorsqu'il y avait eu moins d'échantillons urinaires collectés au cours de la grossesse (un ou deux) (Snijder et al. 2013).

Les études humaines évaluant la corrélation entre l'exposition prénatale ou postnatale précoce au BPA et le risque de développer un excès de poids ou une obésité durant l'enfance et l'adolescence donnent elles aussi des résultats variables. Une étude a montré une corrélation positive entre les taux urinaires de BPA pendant le 1^{er} et le 3^{ème} trimestre de la grossesse et l'IMC et la circonférence abdominale à l'âge de 4 ans (Valvi et al. 2013). Deux autres études réalisées sur une cohorte en Chine ont montré une corrélation positive entre les taux urinaires

maternels de BPA et la circonférence abdominale à l'âge de 7 ans (Guo et al. 2020) et la pression artérielle systolique plus élevée à l'âge de 2 ans (Ouyang et al. 2020). De la même façon, Hoepner *et al* ont démontré une association entre les taux urinaires maternels de BPA et le pourcentage de masse grasse et un périmètre abdominal plus élevé (Hoepner et al. 2016). Par contre, une étude américaine n'a pas trouvé d'association entre les taux de BPA urinaires des mères durant les 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse et l'IMC de l'enfant âgé de 2 à 5 ans (Braun et al. 2014). Il n'y avait par ailleurs pas d'association entre l'IMC et les taux urinaires de BPA chez l'enfant à 1 et 2 ans (Braun et al 2014). Buckley *et al* n'ont pas non plus retrouvé d'association entre les taux urinaires de BPA mesurés au 3^{ème} trimestre de la grossesse et le pourcentage de masse grasse entre l'âge de 4 ans et 9 ans (Buckley et al. 2016). D'autres études ont montré une association inverse entre les taux urinaires de BPA mesurés chez les mères pendant la grossesse et l'IMC chez les filles à l'âge de 9 ans (Harley et al. 2013) et à l'âge de 4 ans (Vafeiadi et al. 2016).

Comme illustré ci-dessus, les données humaines concernant les effets de l'exposition au BPA sur la croissance fœtale et postnatale sont assez variables et parfois contradictoires. Cela peut être en partie expliqué par les spécificités du BPA déjà abordées plus haut (faible demi-vie, modification des taux urinaires en fonction des habitudes de consommation, présence d'autres « stresseurs environnementaux » non pris en compte,...). Il existe par ailleurs une grande variabilité dans la mesure des taux urinaires de BPA au cours de la grossesse (Braun et al. 2011) et l'évaluation de l'exposition fœtale au BPA n'est pas constante entre les études (nombres d'échantillons collectés au cours de la grossesse, âge gestationnel au moment de la collecte,...). Enfin, en ce qui concerne la croissance fœtale, beaucoup de ces études épidémiologiques utilisent le poids de naissance et les paramètres échographiques de croissance fœtale comme marqueur final du métabolisme énergétique du fœtus mais peu étudient des paramètres plus subtils qui pourraient être influencés par le BPA comme la composition corporelle.

Chez le rongeur, la majorité des études montrent que le BPA entraîne une augmentation de poids et de l'adipogenèse, que l'exposition soit prénatale (Angle et al. 2013; Howdeshell et al. 1999), postnatale (Bateman and Patisaul 2008) ou périnatale (Akingbemi et al. 2004; Rubin and Soto 2009; Somm et al. 2009). Chez le mouton, l'exposition durant la gestation au BPA entraîne une prise de poids plus importante chez les fœtus mâles que les fœtus femelles. Par la suite, la cinétique de croissance est opposée chez les deux sexes : la croissance des mâles est lente durant la période postnatale précoce puis on observe un rattrapage par après tandis que chez la femelle, c'est l'inverse (Vyas et al. 2019).

Les effets du BPS sur le contrôle de la croissance et de la balance énergétique commencent à être étudiés au vu de l'exposition du fœtus par voie transplacentaire. L'étude de Hu *et al* a rapporté un risque plus élevé de faible poids à la naissance chez les nouveau-nés avec une exposition plus importante au BPS durant le 1^{er} et 2^{ème} trimestre de la grossesse. L'exposition était évaluée par mesure des concentrations urinaires en BPS à chaque trimestre de la grossesse (Hu et al. 2019). De plus, l'exposition au BPS des nouveau-nés présentant des paramètres anthropométriques au P10 était plus importante par rapport à ceux au P90 (Hu et al. 2019). Une autre étude, réalisée sur une plus petite cohorte dans laquelle le BPS était détecté chez seulement 37% des femmes enceintes, a montré que l'exposition au BPS au 1^{er} trimestre de la grossesse était associée à un faible poids à la naissance (Goodrich et al. 2019). A l'inverse, les données issues d'une large cohorte de femmes enceintes au Pays-Bas ont mis en évidence une association positive entre les taux urinaires maternels de BPS mesurés au 1^{er} trimestre de la grossesse et le périmètre crânien des fœtus mesurés par échographie au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse. Il existait par ailleurs une corrélation positive entre l'exposition maternelle au BPS et un poids de naissance plus élevé (Sol et al. 2021). D'autres études n'ont par contre pas mis en évidence d'association entre l'exposition fœtale au BPS (évaluée par les concentrations urinaires ou dans le sang de cordon) et la

croissance fœtale (Ferguson et al. 2018; Liang et al. 2020; Mustieles et al. 2018; Wan et al. 2018; Zhou et al. 2020). L'étude de Jin *et al* a étudié l'association entre la croissance du nouveau-né dans les premiers mois de vie et les taux de BPS détecté dans le lait maternel une semaine après la naissance mais n'a pas établi de corrélation entre ces deux paramètres (Jin et al. 2020). Les données concernant les effets du BPS sur le risque de développer une obésité ou d'autres anomalies métaboliques sont à l'heure actuelle issues d'études transversales qui ont mis en évidence des taux plus élevés de BPS dans les urines des enfants et adolescents présentant une obésité (Jacobson et al. 2019). Cette association n'est cependant pas retrouvée dans toutes les cohortes étudiées (Kataria et al. 2017 ; Liu et al. 2019). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'études longitudinales ayant corrélié l'exposition du fœtus ou du nouveau-né au BPS et l'impact de cette dernière sur le risque de développer une obésité ou des anomalies du métabolisme énergétique durant l'enfance.

Chez le rongeur, les études visant à établir un lien entre l'exposition au BPS et la croissance fœtale et postnatale donnent lieu à des résultats mitigés selon la période d'exposition étudiée et le sexe. Chez le mâle, l'exposition durant la gestation à des faibles doses de BPS n'a pas d'impact significatif sur le poids de naissance et le poids mesuré à l'âge adulte (PND 80) (Ullah et al. 2019). Les doses d'exposition réelles étaient difficilement mesurables dans cette étude puisque les concentrations en BPS étaient calculées par litre d'eau (5, 25, and 50 µg/L) et que les rates gestantes avaient accès librement à cette dernière. Une autre étude a montré que le poids de naissance n'était pas affecté après exposition durant la gestation à 5 mg/kg/j de BPS administré par voie sous-cutanée et ce dans les deux sexes (Pu et al. 2017). Par contre, lorsque les mâles sont soumis à une alimentation enrichie en graisse en période postnatale, l'exposition durant la gestation au BPS entraîne une augmentation de poids, pour des doses faibles aussi bien que des doses plus fortes (0.05, 0.5, 5 et 50 mg/kg/j) (Ahn et al. 2020). D'autres études ont étudié les effets

de l'exposition au BPS lorsque celle-ci survient durant la gestation mais aussi lors de la lactation et là encore les résultats sont nuancés. Certaines études indiquent que l'exposition à des faibles doses de BPS (10 µg/kg/j et 50 µg/kg/j) durant la gestation et la lactation ne modifie pas le poids et ce dans les 2 sexes (da Silva et al. 2019) tandis que d'autres ont rapporté un gain de poids plus important chez le mâle (Meng et al. 2019a) ou chez la femelle (Meng et al. 2019b) pour des doses d'exposition sensiblement pareilles (100 µg/kg/j).

Effets du BPA et du BPS sur le système reproducteur femelle

Effets du BPA et du BPS sur la fertilité

L'implication possible de l'exposition au BPA sur la fertilité des femmes a été suggérée par un plus haut pourcentage de détection du BPA dans le sérum des femmes infertiles comparés à des femmes fertiles (Caserta et al. 2013 ; La Rocca et al. 2014). Plusieurs études ont par ailleurs étudié la corrélation entre l'exposition au BPA et les résultats d'un traitement de procréation médicalement assistée (PMA). Il apparaît que l'exposition au BPA est associée à une diminution du pic d'oestradiol (Bloom et al. 2011), à une réduction du nombre d'ovocytes produits après stimulation ovarienne (Fujimoto et al. 2011) et à une fréquence plus élevée de défaut d'implantation (Ehrlich et al. 2012).

Sur base des données animales, il apparaît que l'exposition développementale au BPA peut altérer le contrôle de la reproduction en interférant avec les mécanismes de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien et en interférant avec la fonction ovarienne (folliculogénèse et stéroïdogénèse), la réceptivité de l'utérus et l'implantation de l'embryon. Ces données sont reprises de façon exhaustive dans la *review* de Pivonello *et al.* (Pivonello et al. 2020).

En ce qui concerne le BPS, les données sont moins nombreuses au vu du caractère récent de l'intérêt qui lui est porté. L'étude de Philips *et al.*, qui comptait 877 participantes n'a pas montré d'association entre les concentrations urinaires

en BPS au 1^{er} trimestre de la grossesse et la fécondité (définie comme le délai avant la conception). Par contre, il existait une corrélation entre la somme des bisphénols mesurés au 1^{er} trimestre de la grossesse et la fécondité chez les femmes qui n'avaient pas reçu une supplémentation adéquate en acide folique (Philips et al 2018). Une autre étude réalisée dans une population de femmes chinoises fréquentant une clinique de la fertilité a montré une association entre les taux urinaires de BPS et une diminution de la réserve ovarienne (attestée sur base des taux d'AMH, de FSH et d'oestradiol) (Zhang et al. 2023).

Chez l'animal, une étude a montré que l'exposition durant la gestation à des faibles doses de BPS (de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) est associée à une irrégularité des cycles oestriques dans la descendance (Shi et al. 2019), altération non retrouvée après exposition durant la même période mais cette fois avec des doses de BPS de l'ordre du $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ (Tucker et al. 2018). Une autre étude a montré une irrégularité des cycles après exposition postnatale à une forte dose de BPS (Ahsan et al. 2018). Cette même exposition augmente le nombre de follicules atrétiques et kystiques au sein des ovaires (Ahsan et al. 2018). L'étude de Shi *et al* a mis en évidence une réduction du nombre de follicules primaires et secondaires au sein des ovaires des nouveaux nés exposés durant la gestation au BPS (Shi et al. 2019). De façon intéressante, une étude a montré que l'exposition au BPS durant la grossesse avait des effets transgénérationnels sur le système reproducteur femelle puisque les femelles de la 3^{ème} génération exposées au BPS présentaient des irrégularités du cycle oestral. Le développement folliculaire en période néonatale n'était par contre pas affecté (Shi et al. 2019b).

Effets du BPA et du BPS sur le timing pubertaire

Chez l'humain, les données concernant l'influence d'une exposition précoce au BPA sur le timing pubertaire sont variables en fonction des études. Chez la fille, Watkins *et al* n'ont pas montré d'association entre les concentrations urinaires

maternelles de BPA au 3^{ème} trimestre de la grossesse et l'entrée en puberté (Stade de Tanner 2) ou l'âge de la ménarche (Watkins et al. 2014). De façon similaire, une autre étude n'a pas montré de lien entre l'âge de la ménarche et les taux urinaires de BPA durant l'enfance (Wolff et al. 2017). Par contre, les résultats du suivi longitudinal de la cohorte « CHAMACOS » ont montré que l'âge de la ménarche était retardé chez les filles qui avaient été exposées *in utero* à des taux plus élevés de BPA (exposition attestée par la mesure des taux urinaires de BPA à 2 reprises durant la grossesse) (Berger et al. 2018).

Comme chez l'humain, les données obtenues chez le rongeur concernant les effets de l'exposition périnatale au BPA sur le timing pubertaire donnent des résultats nuancés. La plupart des études ont été menées chez la femelle. Chez la femelle, quand les animaux sont exposés au BPA durant la gestation, l'âge à l'ouverture vaginale est soit avancé (Honma et al. 2002; Nikaido et al. 2004; Nah et al. 2011; Ruiz-Pino et al. 2019; Dong et al. 2022; Shi et al. 2019a), soit normal (Howdeshell et al. 1999; Murray et al. 2007; Tinwell et al. 2002; Tucker et al. 2018). De façon intéressante, le timing pubertaire est impacté différemment en fonction de la période d'exposition durant la gestation : l'ouverture vaginale est précoce pour une exposition entre le GD 1 et GD 6 ou entre le GD7 et le GD12 tandis qu'une exposition plus tardive n'influence pas le timing pubertaire (GD13-GD18) (Wang et al. 2023). Si l'exposition a lieu après la naissance durant la période postnatale précoce, l'âge à l'ouverture vaginale peut être soit avancé (Adewale et al. 2009; Fernández et al. 2009; Losa-Ward et al. 2012; Nah et al. 2011; Yang et al. 2014; Franssen et al. 2016; Qiu et al. 2020) soit normal (Adewale et al. 2009; Losa-Ward et al. 2012; Nagao et al. 2001; Nikaido et al. 2005; Yang et al. 2014; Yu et al. 2010) soit retardé (Franssen et al. 2016). De façon intéressante, une dose de 5 mg/kg/j entraîne une avance de l'initiation de la puberté tandis qu'une dose de 25 ng/kg/j entraîne un retard pubertaire, ce qui suggère des effets opposés sur le timing pubertaire en fonction des doses de BPA et donc des mécanismes d'action

différents (Franssen et al. 2016). Lorsque l'exposition durant la gestation se prolonge après la naissance, il n'y a pas de modification de l'âge à l'ouverture vaginale (Ferguson et al. 2014; Naulé et al. 2014; Panagiotidou et al. 2014; Ryan et al. 2010) à l'exception d'une étude qui montrait un retard pubertaire après exposition à une dose de 50 µg/kg/j (Naulé et al. 2014). Ces données parfois contradictoires concernant les effets de l'exposition périnatale au BPA illustrent l'importance de la période et de la dose d'exposition

Lorsqu'on étudie les mécanismes impliqués dans les modifications du timing pubertaire suite à l'exposition au BPA, certaines études ont montré l'implication de mécanismes neuroendocriniens. Par exemple, l'avance et le retard pubertaire observés après exposition postnatale respectivement à 5 mg/kg/j et 25 ng/kg/j de BPA sont associés à une accélération et un ralentissement de la fréquence de la sécrétion pulsatile de GnRh (Franssen et al. 2016). De plus, l'exposition à la dose de 5mg/kg/j réduit le tonus GABAergique au niveau de l'hypothalamus et augmente l'expression de l'ARNm de nombreux gènes de la voie de signalisation GABAergique alors que la dose de 25 ng/kg/j induit exactement l'inverse. L'étude de Wang *et al* a par ailleurs mis en évidence une élévation des taux de kisspeptin et de GnRH dans le sérum des souris femelles présentant une puberté avancée après exposition durant la gestation au BPA (Wang et al. 2023). Les effets neuroendocriniens des perturbateurs endocriniens ayant un impact sur le timing pubertaire sont décrits de façon exhaustive dans la *review* de Parent *et al* (Parent et al. 2015).

Au vu du caractère récent de l'utilisation du BPS, il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude chez l'humain ayant évalué l'association entre l'exposition prénatale ou postnatale précoce au BPS et le timing pubertaire. Chez le rat ou la souris, les études évaluant les effets de l'exposition au BPS sur le timing pubertaire montrent des résultats assez variés qui, comme pour le BPA, peuvent être en partie expliqués par les différentes périodes et doses d'exposition. Chez la femelle, l'exposition au BPS

durant la gestation n'a pas d'impact sur l'initiation de la puberté (Kolla et al. 2019; Tucker et al. 2018). L'exposition postnatale précoce au BPS mène à des pubertés retardées (Ahsan et al. 2018) tandis qu'une exposition prolongée depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte mène à des pubertés avancées (Shi et al. 2017). De façon intéressante, l'exposition durant la gestation au BPS peut avoir des effets transgénérationnels avec une avance de l'initiation de la puberté au niveau de la 3^{ème} génération (Shi et al. 2019a).

Effets du BPA et du BPS sur le système reproducteur mâle

Effets du BPA et du BPS sur la fertilité

Les données humaines concernant les effets de l'exposition au BPA sur la fertilité chez l'homme sont pour la plupart obtenues à partir d'études épidémiologiques transversales dans lesquelles la qualité du sperme est utilisée comme marqueur de la fertilité. Les résultats divergent en partie en fonction du type de population étudiée mais aussi en fonction des études. Deux études ont montré une association négative entre les concentrations urinaires en BPA et des paramètres de qualité du sperme dans une population générale (Adoamnei et al. 2018 ; Lassen et al. 2014) tandis qu'une autre étude menée sur un plus grand nombre de sujets ne retrouvait pas d'association significative (Goldstone et al. 2015). L'étude de Chen *et al* n'a pas montré de différence significative entre les concentrations urinaires de BPA d'hommes présentant une infertilité idiopathique comparés à celles d'hommes sans trouble de la fertilité (Chen et al. 2013). Une autre étude menée chez des couples pris en charge en PMA a par contre mis en évidence une association négative entre les concentrations urinaires en BPA des hommes et la qualité du sperme (évaluée sur base du nombre de spermatozoïdes, de la concentration en spermatozoïdes et de la vitalité du sperme) (Knez et al. 2014). A l'inverse, une autre étude qui cette fois a étudié des hommes avec une fertilité normale (dont la compagne était enceinte) n'a pas montré d'association entre les taux urinaires de

BPA et les paramètres du sperme (Mendiola et al. 2010). Lorsque d'autres paramètres de fertilité ont été étudiés, tels que la durée avant la conception ou la réponse à un traitement de PMA, les études n'ont pas montré de corrélation positive avec les concentrations urinaires en BPA chez le père (Buck Louis et al. 2014 ; Dodge et al. 2015). D'autres études se sont intéressées aux effets potentiels du BPA sur l'ADN spermatique et les marques épigénétiques qui régulent son expression. En effet, toutes ces marques sont transmises à la descendance lors de la fécondation et peuvent ainsi expliquer des effets transgénérationnels de l'exposition au BPA. Une étude menée chez des étudiants espagnols a montré que chez les garçons présentant un taux de fragmentation du sperme supérieur à 30%, il existait une corrélation positive entre les taux urinaires de BPA et un pourcentage plus élevé de fragmentation du sperme (Kiwitt-Cárdenas et al. 2021). Une autre étude a montré que le niveau d'hydroxyméthylation d'un gène régulant notamment l'apoptose des cellules du sperme était plus élevé chez des hommes exposés au BPA comparés à une population contrôle non exposée (Song et al. 2019). Cela suggère l'implication de mécanismes épigénétiques pour expliquer les effets de l'exposition au BPA sur le contrôle de la reproduction. Chez l'humain, à notre connaissance, une seule étude a tenté d'établir un lien entre l'exposition prénatale au BPA et la fonction testiculaire à l'âge adulte. Une corrélation positive a été établie entre les taux sanguins maternels en BPA (mesurés à la 18^{ème} et la 14^{ème} semaine de grossesse) et la concentration et la motilité des spermatozoïdes de leur garçon à l'âge de 20 ans. Il n'y avait par contre pas d'association avec le volume testiculaire et les concentrations en testostérone, en LH, en FSH et en inhibine B (Hart et al. 2018). Il est à noter que 149 garçons ont été suivis dans cette étude et que l'exposition postnatale et péripubertaire de ces garçons au BPA n'était pas prise en compte.

Les difficultés déjà discutées des études épidémiologiques humaines concernant les effets du BPA font que la plupart des données concernant l'impact de

l'exposition prénatale ou postnatale précoce au BPA sur le contrôle de la reproduction proviennent des études animales.

Chez la souris, l'exposition néonatale précoce au BPA réduit le nombre et la motilité des spermatozoïdes à l'âge adulte et altère la morphologie des spermatozoïdes (Aikawa et al. 2004). Ces altérations sont également décrites après exposition durant la gestation et la lactation au BPA, et ce dans la descendance jusqu'à la 3^{ème} génération (Salian et al. 2009). D'autres études chez l'animal ont montré que les mâles exposés *in utero* au BPA ont des concentrations sanguines et intratesticulaires de testostérone diminuées (Hong et al. 2016), une altération du développement testiculaire et de la spermatogenèse (Hong et al. 2016) ainsi qu'une diminution de nombre de spermatozoïdes (Rahman et al. 2017). Une autre étude a par ailleurs démontré que l'exposition au BPA durant le développement testiculaire a un impact sur le pool de cellules souches embryonnaires à l'origine des spermatides (Vrooman et al. 2015).

Comme pour le BPA, la plupart des études épidémiologiques humaines concernant l'association entre l'exposition au BPS et le système reproducteur chez l'homme sont des études transversales qui tentent d'établir une corrélation entre les concentrations urinaires en BPS et différents paramètres du sperme. Une étude réalisée sur une population d'hommes fréquentant une clinique de la fertilité a montré un pourcentage plus élevé d'anomalies du sperme (concentration, motilité et morphologie) chez les individus avec des taux détectables de BPS comparés aux individus avec des taux non détectables. Il est à noter que cette association était particulièrement retrouvée chez les sujets en surpoids ou obèses (Ghaida et al. 2020). Une autre étude sur une large cohorte chinoise toujours recrutée dans un centre de la fertilité a également mis en évidence une association négative entre les taux urinaires de BPS et la motilité du sperme (Chen et al. 2022).

En raison de son utilisation croissante, les études animales concernant les effets de l'exposition au BPS sur le système reproducteur mâle sont de plus en plus nombreuses. Il a été montré que l'exposition au BPS durant la gestation et/ou la période postnatale précoce diminue la production quotidienne de spermatozoïdes (Ullah et al. 2019) ; réduit la motilité et le nombre de spermatozoïdes et induit des altérations histologiques au sein des testicules (Shi et al. 2018 ; Ullah et al. 2019). Il apparaît que ces effets peuvent être transgénérationnels, puisque ces anomalies sont retrouvées au sein de la 3^{ème} génération de mâles exposés *in utero* (Shi et al. 2019b). De façon intéressante, l'étude de Shi *et al* a montré une modification de l'expression des enzymes régulant la méthylation de l'ADN et les modifications des histones au sein des testicules après exposition précoce au BPS (Shi et al. 2018), ce qui suggère l'implication de mécanismes épigénétiques dans les anomalies observées au sein du système reproducteur mâle après exposition au BPS.

Effets du BPA et du BPS sur le timing pubertaire

Il existe quelques études chez l'humain ayant tenté d'établir un lien entre l'exposition précoce au BPA et l'âge à l'entrée en puberté chez les garçons. L'étude de Berger *et al* a montré une avance de l'âge au moment de l'entrée en puberté chez les garçons qui avaient été exposés à des taux plus élevés de BPA *in utero* (Berger et al. 2018). De façon opposée, une autre étude n'a pas montré d'association entre les taux urinaires de BPA au 3^{ème} trimestre de la grossesse et le timing de la puberté chez les garçons ; il n'y avait pas non plus d'association avec l'exposition au BPA durant la période pré-pubertaire (Ferguson et al. 2014).

. Les données animales concernant le timing pubertaire chez le mâle après exposition précoce au BPA sont très peu nombreuses. L'étude de Oliveira et al a montré que l'exposition gestationnelle et postnatale précoce au BPA entraîne un retard pubertaire (Oliveira et al. 2017).

En ce qui concerne le BPS, une étude chez le mâle n'a pas montré de modification du timing pubertaire après exposition au BPS (Ullah et al. 2019). Par contre, une autre étude a montré que l'exposition au BPS peut avoir des effets transgénérationnels sur le timing pubertaire comme en témoigne l'avance de l'âge au moment de l'entrée en puberté chez les mâles de la 3^{ème} génération (Shi et al 2019b).

3. Implication des mécanismes épigénétiques dans le DOHaD et la perturbation endocrinienne

3.1 Définition et aspects généraux

L'épigénétique fait référence aux mécanismes moléculaires qui modifient l'expression des gènes sans qu'il n'y ait de variation au sein de la séquence de l'ADN. Ces modifications sous-tendent la programmation, au cours du développement fœtal et postnatal, aboutissant au façonnage des tissus et des organes. Une programmation épigénétique erronée peut avoir des effets sur la santé de l'enfant et surtout plus tard à l'âge adulte et pourrait même être transmise à la génération suivante. Par opposition à la grande stabilité de la séquence de l'ADN, les marqueurs épigénétiques sont très labiles et ainsi fortement sensibles à l'exposition aux facteurs environnementaux et par principe réversibles. Ils apparaissent donc comme des candidats biomarqueurs de la programmation fœtale sous l'influence de l'environnement.

En 1939, Waddington utilise le terme « epigenetic landscape » pour décrire les mécanismes moléculaires et biologiques qui sous-tendent la transformation d'un génotype en un phénotype (*Waddington CH (1939) An introduction to modern genetics*). En l'absence de changement dans la séquence de l'ADN, la régulation de l'expression des gènes va activer ou inhiber des voies de signalisations moléculaires qui vont déterminer le développement de la santé ou de pathologies chez l'individu.

Pour mieux comprendre les concepts de génétique et épigénétique, nous pouvons utiliser la métaphore suivante : la génétique correspond au disque dur de l'ordinateur et l'épigénétique peut être assimilée à l'ensemble des logiciels installés sur cet ordinateur. Sans disque dur, il n'y a pas d'ordinateur. Et sans logiciels, l'ordinateur ne sert pas à grand-chose. Sans génétique il n'y a pas de vie. Et sans épigénétique, il n'y aurait pas de différenciation cellulaire et donc nous ne pourrions pas remplir nos fonctions biologiques. La génétique et l'épigénétique sont donc étroitement liées et se complètent pour définir le fonctionnement d'un organisme. Par opposition aux marques génétiques qui sont stables et irréversibles, les marques épigénétiques sont labiles et sensibles à l'environnement qui peut ainsi moduler l'information codée par les gènes. On peut illustrer cela avec l'exemple de jumeaux monozygotes: ils naissent avec le même patrimoine génétique mais peuvent avoir des profils épigénétiques différents, en fonction de l'environnement dans lequel ils grandissent, ce qui peut mener à des phénotypes différents en terme de santé ou de développement de pathologies (Kaminsky et al. 2009).

Notre patrimoine génétique est identique dans toutes nos cellules. Au sein du noyau, il entoure un complexe protéique formé de 4 paires d'histones formant une série de « perles » appelées nucléosomes. Des changements réversibles apposés soit sur la séquence d'ADN (méthylation de l'ADN), soit sur les histones, vont avoir un impact sur le degré de condensation de la chromatine et ainsi permettre à un gène d'être transcrit ou au contraire réprimé.

Les principaux mécanismes épigénétiques sont la méthylation de l'ADN que nous décrivons en détail par la suite, les modifications des histones et les ARN non codants (Figure 8).

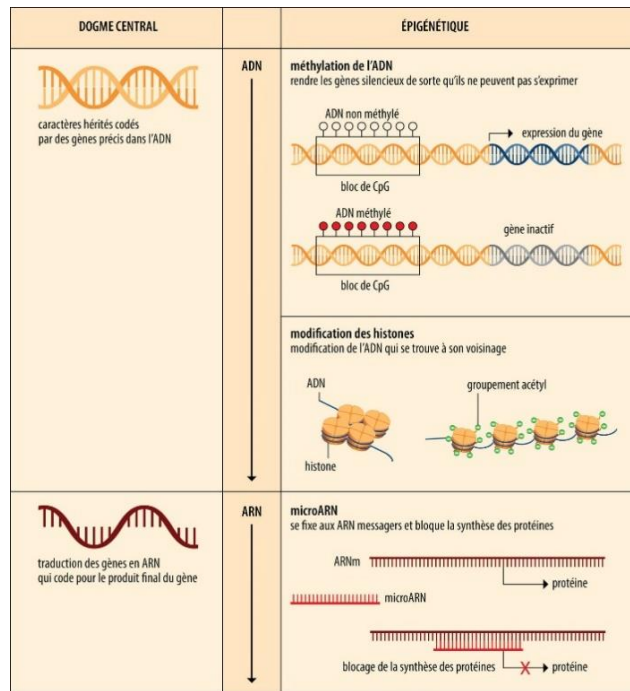


Figure 8 : principaux mécanismes épigénétiques : méthylation de l'ADN, modification des histones et micro ARN (Defossez et al. Encyclopædia Universalis France)

Brièvement, les modifications des histones modulent le degré de compaction de la chromatine et l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. L'acétylation et la méthylation des histones sont les deux principales modifications des histones et sont associées respectivement à une activation ou une répression de l'expression des gènes (Bannister and Kouzarides 2011). Les ARN non codants comprennent les petits ARN non codants et les longs ARN non codants, ces derniers étant moins bien étudiés. Les petits ARN non codants comptent en moyenne de 18 à 25 nucléotides. Ils régulent l'expression des gènes en interagissant avec des ARN messagers cibles. Si la complémentarité de séquence est parfaite entre le micro ARN et l'ARNm, ce dernier est dégradé. Si la complémentarité de séquence est imparfaite, il n'y aura

pas de dégradation de l'ARNm mais une inhibition de sa traduction en protéine (Yao et al. 2019). Les longs ARN non codants sont constitués de plus de 200 nucléotides. Leurs mécanismes d'action diffèrent des microARN, puisqu'ils modulent l'expression de gènes en ciblant des activateurs et des répresseurs transcriptionnels et non pas la séquence d'ARNm directement (Filipowicz et al. 2008).

Ces mécanismes sont impliqués dans toute une série de processus moléculaires physiologiques dont la transcription, la réparation-réplication, la condensation, l'inactivation du chromosome X (Balaton and Brown 2021), la régulation des gènes soumis à l'empreinte parentale, le vieillissement, le dimorphisme sexuel, etc. En parallèle à cela, de plus en plus d'études suggèrent un rôle joué par l'épigénétique dans la survenue de nombreuses pathologies (cancer, pathologies endocriniennes, pathologies neuro-développementales, etc) (Zhang et al. 2020).

3.2 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le plus étudié et le mieux caractérisé à l'heure actuelle. D'un point de vue moléculaire, elle consiste en l'ajout d'un groupe méthyl sur le carbone en position 5 d'une base cytosine à la place d'un atome d'hydrogène au sein d'un dinucléotide cytosine-guanine (CpG). Elle transforme donc une base cytosine en une base 5-méthyl cytosine au sein de l'ADN (figure 9). Chez l'homme, les 5-méthyl-cytosines (5mC) représentent environ 1 % de toutes les bases composant le génome et elles occupent 70-80 % des dinucléotides CpG (Blackledge and Klose 2011). Les îlots CpG sont des régions du génome riches en CpG, dont la plupart ne sont pas méthylés. Ils sont surtout situés au niveau des promoteurs des gènes (50%) mais aussi dans des régions intragéniques (25%) et intergéniques (25%) (Deaton and Bird 2011).

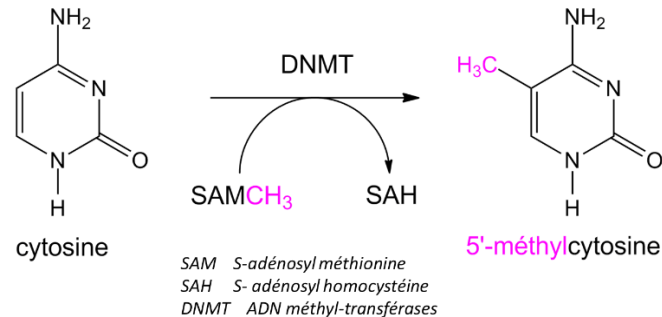


Figure 9 : schéma de la réaction de méthylation des bases cytosines de l'ADN

L'établissement du profil de méthylation et le maintien de ce dernier au cours des divisions cellulaires se fait grâce à l'action des DNA méthyltransférases (DNMTs). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupe méthyl à partir de S-adénosyl méthionine à la cytosine d'un dinucléotide CpG (Dan and Chen 2022). Les protéines de la famille des DNMTs sont constituées de 5 membres : DNMT1; DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3l. L'enzyme DNMT1 est responsable de la transmission du profil de méthylation au cours de la réplication du génome. Les DNMT3a, 3b et 3l sont responsables de l'établissement du profil de méthylation (méthylation de novo) (Gopalakrishnan et al. 2008) Classiquement, la présence de cytosines méthylées au sein de la séquence promotrice d'un gène est associée à une répression transcriptionnelle car elle inhibe directement la fixation de certains facteurs de transcription et recrute des inhibiteurs de la famille des MBP (methyl binding proteins) ou encore des ARN non codants (Bird and Wolffe 1999). Cette réaction est par exemple à l'origine de la répression de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs rencontrés dans certains cancers (Nishiyama and Nakanishi 2021) ou à l'origine de la vague de reprogrammation épigénétique observée au cours de la gamétogenèse et de l'embryogenèse (Hill et al. 2018). Bien que faisant partie des DNMTs, le rôle de la DNMT2 dans la méthylation de l'ADN n'est actuellement pas bien défini (Okano et al. 1998). Contrairement à la

méthylation de l'ADN qui est un processus uniquement actif, la déméthylation de l'ADN est un processus actif ou passif. La déméthylation active de l'ADN implique une série de réactions enzymatiques successives catalysées par la famille des enzymes TETs (ten eleven translocation), incluant TET1, TET 2 et TET 3 (Wu and Zhang 2011). Ces dernières catalysent l'hydroxylation des 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine et puis son oxydation en 5-formylcytosine (5fC) et en 5-carboxycytosine (5caC). Ces deux dernières bases vont être éliminées par l'action d'une glycosylase (type thymine ADN glycosylase-TDG) et du système de réparation BER (*base excision repair*) et une cytosine classique va réapparaître (figure 10). La déméthylation passive est lié à l'absence de méthylation d'un nouveau brin d'ADN synthétisé par la DNMT1 au fil des différentes divisions cellulaires. Ainsi, l'inhibition de l'activité ou de l'expression de DNMT1 va conduire à une hypométhylation de l'ADN (Smith and Meissner 2013).

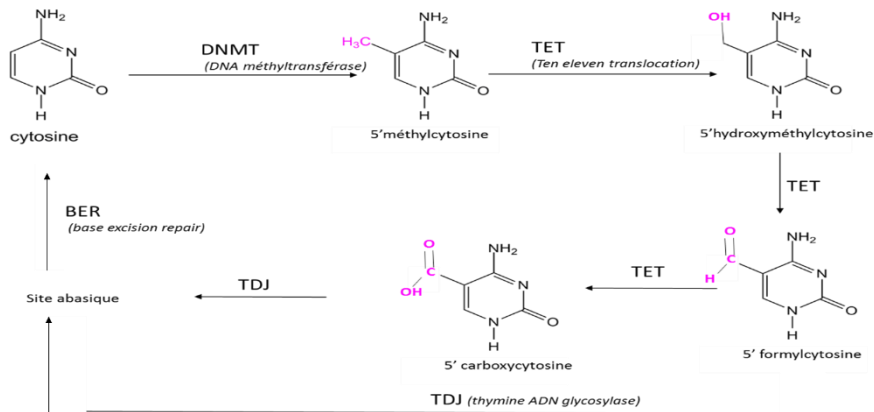


Figure 10 : Mécanismes de déméthylation active de l'ADN (adaptée de Cartron et al. 2015)

3.3 Implication des mécanismes épigénétiques dans le DoHaD

Chez l'humain, il existe deux grandes fenêtres de susceptibilité durant lesquelles surviennent des modifications épigénétiques profondes : d'abord la gamétogenèse et le développement préimplantatoire précoce et ensuite le développement de l'embryon et du fœtus comprenant l'organogenèse, la croissance fœtale puis la

maturation postnatale (Heard and Martienssen 2014). Durant la gamétogenèse, on observe d'abord un effacement des marques épigénétiques au niveau des cellules germinales primordiales des gamètes parentaux et un nouveau profil épigénétique est ensuite établi durant la différenciation des gamètes (Lempradl 2020). Au tout début du développement, après la fécondation, les marques épigénétiques spécifiques des gamètes parentaux sont presque entièrement effacées avec des niveaux de méthylation les plus bas observés au stade blastocyste. Elles sont ensuite remplacées par de nouvelles marques épigénétiques qui vont permettre aux cellules de devenir pluripotentes (Messerschmidt et al. 2014). Les marques épigénétiques mises en place au cours des différenciations cellulaires lors de l'organogenèse ou lors des phases de croissance fœtale et postnatale, vont permettre d'assurer un développement harmonieux des différentes parties de l'organisme (Safi-Stibler and Gabory 2020) (Figure 11).

Ces vagues de plasticité épigénétique constituent donc des périodes de susceptibilité par rapport aux effets de l'environnement sur l'épigénome, avec une influence possible de l'environnement paternel ou maternel lors de la gamétogenèse et une influence de l'environnement maternel lors de la phase de développement embryonnaire et fœtal. Ces altérations épigénétiques précoces en réponse à un environnement subnormal peuvent être le substrat de la prédisposition de l'individu à développer une maladie plus tard dans la vie, lorsqu'il sera exposé à un nouveau stress environnemental. Il s'agit donc plus d'une prédisposition que d'une programmation.

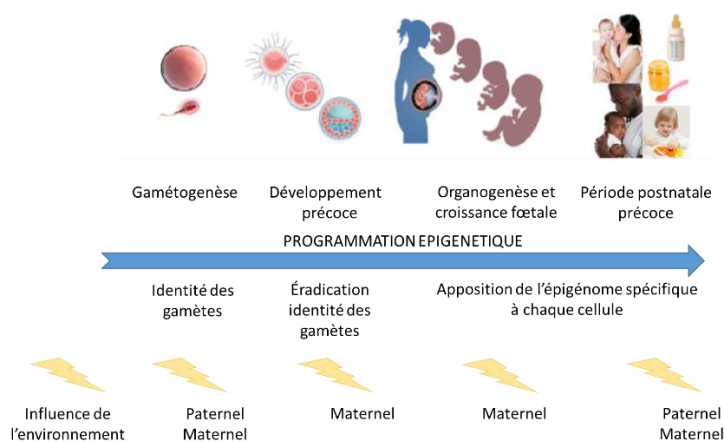


Figure 11 : Fenêtres de susceptibilité par rapport à la programmation épigénétique de l'individu en fonction de l'environnement paternel ou maternel (adaptée de Panchenko et al. 2015)

3.4 Effets du BPA et du BPS sur la méthylation de l'ADN

La première étude ayant suggéré un effet du BPA sur la méthylation de l'ADN date de 2006 lorsque l'équipe de Ho *et al* a montré que l'exposition néonatale au BPA entraînait un risque accru de développer des lésions prénéoplasiques au sein de la prostate chez l'adulte. Cette prédisposition était associée à une hypométhylation du gène PDE4D4 (phosphodiésterase de type 4), qui code pour un facteur de croissance impliqué dans la régulation de l'AMPc. Il en résultait une augmentation persistante de l'expression de PDE4D4 (Ho et al. 2006). Peu après, l'équipe de Dolinoy a utilisé un modèle de souris dont la couleur du pelage varie en réponse à des modifications de la méthylation de l'ADN. Dolinoy *et al* ont mis en évidence des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau du génome de la descendance de femelles exposées au BPA durant la gestation et durant la lactation (Dolinoy et al. 2007). Par la suite, d'autres études réalisées chez l'animal ont investigué les effets de l'exposition développementale au BPA sur la méthylation de gènes spécifiques au sein d'organes cibles tels que l'utérus (Bromer et al. 2010), le testicule (Doshi et al. 2011), la prostate (Tang et al. 2012) ou encore le cerveau (Yaoi et al. 2008) qui pourraient expliquer les variations de l'expression de certains

gènes dans ces tissus et les manifestations phénotypiques observées plus tard dans la vie. Par exemple, il a été montré chez le rat, que l'exposition au BPA (50 µg/kg/j) durant la gestation et la lactation entraînait une résistance à l'insuline et des taux d'insuline plus élevés à l'âge adulte (21 semaines). Ces modifications métaboliques étaient précédées par une diminution de la méthylation globale de l'ADN au niveau hépatique à 3 semaines de vie en parallèle à une augmentation de l'expression de l'ARNm de DNMT3b (Ma et al. 2013).

Contrairement à certains modèles animaux qui ont réussi à établir un lien entre les modifications de méthylation de l'ADN induites par le BPA et les conséquences phénotypiques de ce dernier, les études humaines actuelles tentent de démontrer les effets de l'exposition au BPA sur la méthylation de l'ADN sans forcément établir un lien avec les conséquences phénotypiques de ces modifications épigénétiques. Nous ne citerons dans ce paragraphe que quelques-unes des études humaines qui ont établi une corrélation entre l'exposition prénatale au BPA et des modifications de méthylation de l'ADN au sein du sang de cordon puisque les effets de l'exposition au BPA sur l'épigénome placentaire seront décrits de façon plus précise dans le chapitre 4.3 de cette introduction.

L'étude de Hanna *et al* a été réalisée chez des femmes recevant une stimulation ovarienne dans le cadre d'une fécondation in vitro. L'exposition au BPA était estimée sur base des concentrations sanguines de BPA non conjugué. Dans cette cohorte de 36 femmes, la méthylation du promoteur du gène *TSP50* (testes-specific protease 50) était plus élevée chez les femmes avec un faible niveau d'exposition au BPA. Bien qu'il ait été rapporté que l'expression de ce gène était augmentée dans le cancer du sein, la signification fonctionnelle de cette modification de méthylation de l'ADN chez ces femmes reste inconnue (Hanna et al. 2012). Une autre étude a établi une corrélation positive entre les concentrations urinaires en BPA à la 24^{ème} semaine de grossesse et la méthylation de l'ADN de LINE 1 au sein du sang de cordon (Navarro-Lafuente et al. 2022). Cette association n'était pas

retrouvée dans une autre cohorte du Michigan qui cette fois évaluait l'exposition prénatale au BPA par la mesure des concentrations urinaires en BPA au 1^{er} trimestre de la grossesse (Montrose et al. 2018). L'étude de Miura *et al* a elle illustré les effets différents selon le sexe de l'exposition prénatale au BPA sur la méthylation de l'ADN au sein du sang de cordon. Les sites CpG différenciellement méthylés en rapport avec des taux plus élevés de BPA dans le sang de cordon étaient hypométhylés dans 98 % des cas chez les filles et hyperméthylés dans 88% des cas chez les garçons (Miura et al. 2019).

Certaines études ont étudié le profil de méthylation de gènes spécifiques au sein du sang de cordon. Il existe une corrélation positive entre l'exposition prénatale au BPA (évaluée sur base des concentrations urinaires en BPA entre la 12^{ème} et la 16^{ème} semaine de grossesse) et le niveau de méthylation au sein des promoteurs des gènes *CAPS2*, *TNFRSF25*, and *HKR1*. *CAPS2* joue notamment un rôle dans le développement neuronal (Song et al. 2020). Le promoteur du gène *MEST* (mesoderm specific transcript) apparaît hypométhylé dans le sang de cordon des enfants dont l'exposition prénatale au BPA est plus élevée (4^{ème} quartile). Cette hypométhylation était associée à une augmentation de l'expression de ce gène associé à l'obésité. Ces modifications contribuaient à l'augmentation du Z-score de BMI jusqu'à l'âge de 6 ans (Junge et al. 2018). Dans une autre étude, la méthylation du gène *IGF2R* (insulin growth factor receptor 2), jouant un rôle clé dans la croissance foetale, était augmentée chez les enfants avec un niveau d'exposition *in utero* au BPA plus élevé. Ce gain de méthylation du gène *IGFR2* à l'âge de 2 ans était associé à une augmentation plus importante de l'IMC chez les filles entre l'âge de 2 et 8 ans, phénomène non observé chez les garçons (Choi et al. 2020). L'étude de Huang *et al* a montré un lien entre l'exposition *in utero* au BPA et un faible poids de naissance. Il n'y avait cependant pas d'association avec les modifications de méthylation de l'ADN au sein du sang de cordon (Huang et al. 2021).

Il existe très peu de données concernant les effets épigénétiques du BPS à l'heure actuelle. Chez l'animal, une étude a montré des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau hépatique chez le mâle. A noter que ces modifications survenaient après une exposition qui commençait durant la gestation et se prolongeait de façon chronique jusqu'à l'âge adulte (Brulport et al. 2020). Dans une lignée cellulaire de cancer du sein (MCF-7), l'exposition au BPS modifie la méthylation de l'ADN au sein des transposons (Huang et al. 2019).

4. Implication du placenta dans le DOHaD

Situé à l'interface entre la mère et le fœtus, le placenta joue un rôle clé dans la mise en place des processus homéostatiques régulant le développement et la croissance du fœtus. Tant la structure et les fonctions du placenta sont soumises à une régulation dynamique par des facteurs environnementaux. Nous allons d'abord décrire les caractéristiques morphologiques et les principales fonctions du placenta ainsi que les données qui suggèrent l'implication du placenta dans la programmation fœtale de la santé de l'individu. Nous aborderons ensuite les données existantes concernant les effets possibles de l'exposition au BPA et au BPS sur le placenta, en se focalisant sur les modifications du transcriptome et de l'épigénome placentaire et les altérations morphologiques.

4.1 Caractéristiques morphologiques du placenta humain et murin

Même si le placenta humain et le placenta murin sont tous deux dits hémochoriaux c'est-à-dire que le sang maternel est en contact direct avec les villosités choriales fœtales, ils ont des caractéristiques anatomiques qui leur sont spécifiques.

Chez l'humain, la villosité chorale est l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. Elle flotte librement dans la chambre intervillieuse et est en contact avec

le sang maternel acheminé par les artères utérines. Après la phase initiale d'implantation et l'invasion de l'endomètre par les cellules trophoblastiques, ces dernières se différencient selon deux voies distinctes: d'une part les cytotrophoblastes villeux (CTV) et d'autre part les cytotrophoblastes extra-villeux (CTEV). Le CTV fusionne et forme le syncytiotrophoblaste (ST). Ce sont ces cellules qui assurent les échanges fœto-maternels et les fonctions endocrines du placenta. Le CTEV prolifère puis devient invasif et migre dans la décidue et le myomètre. Il envahit et assure le remodelage des vaisseaux maternels (CTEV endovasculaire), phénomène indispensable à la croissance et au développement du fœtus puisqu'il favorise l'apport de sang maternel dans l'espace inter-villeux. Le CTEV se différencie également en cellules géantes plurinucléées. D'un point de vue anatomique, le placenta humain comporte une partie fœtale dite la plaque choriale et une partie maternelle dite la plaque basale (Figure 12A)

Au niveau du placenta murin, on distingue trois couches placentaires depuis le versant fœtal vers le versant maternel. La zone labyrinthique est l'unité fonctionnelle du placenta, là où ont lieu les transferts de nutriments ou de gaz. A ce niveau, le sang fœtal est séparé du sang maternel par 3 couches cellulaires: deux couches de syncytiotrophoblastes (Synt-I ; Synt-II), elles-mêmes adjacentes à une couche de cellules géantes sinusoidales. La zone jonctionnelle ou spongiotrophoblaste, est composée de cellules géantes trophoblastiques et de

cellules à glycogène essentiellement. Enfin, la décidue maternelle constitue la partie maternelle du placenta murin (Figure 12B).

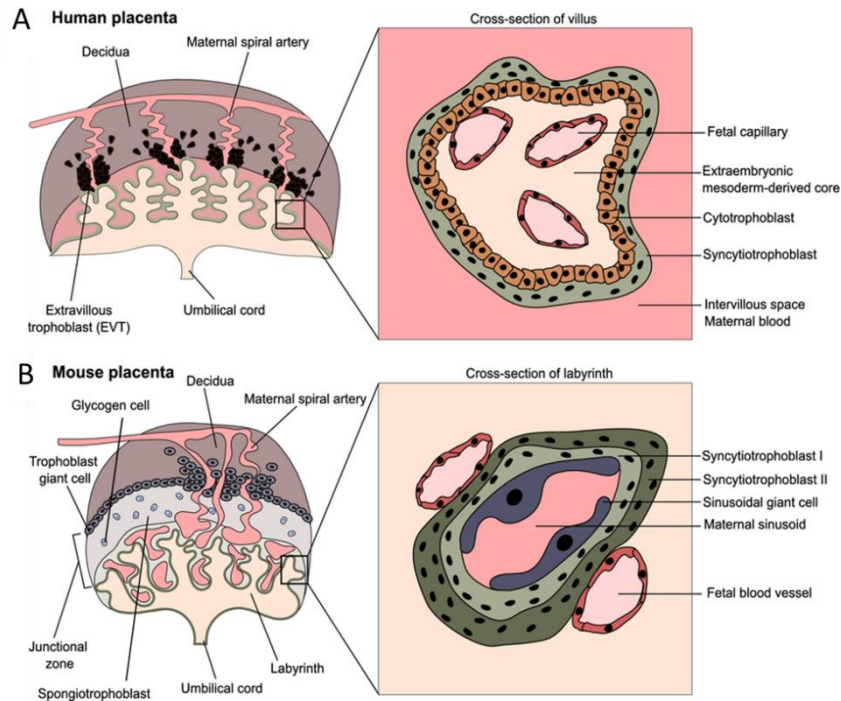


Figure 12 : Comparaison de l'anatomie du placenta humain (A) et du placenta murin (B) (Papuchova et Latos 2022)

Les principales différences structurelles entre les deux placentas sont les suivantes : au niveau de la zone labyrinthique du placenta murin, 3 couches cellulaires séparent le sang maternel du sang fœtal tandis que chez l'humain, au sein des villosités chorales, une seule couche fait office de séparation. De plus, dans le placenta murin, l'invasion de la paroi utérine par les cellules géantes trophoblastiques et les cellules à glycogène est beaucoup moins profonde que l'invasion par les cellules humaines (cytotrophoblaste extra-villeux) (Soncin et al. 2015)

4.2 Fonction du placenta

Afin de comprendre comment des modifications de la fonction placentaire peuvent affecter la programmation fœtale, il est important de connaître quelles sont les fonctions essentielles du placenta et leurs effets sur le développement du fœtus.

La formation du placenta résulte d'interactions cellulaires et moléculaires entre les tissus embryonnaires et utérins, initiés au cours de l'implantation et qui évoluent au cours de la grossesse. En parallèle à son rôle dans l'implantation de l'embryon dans l'utérus, une des principales fonctions du placenta est la régulation des échanges foeto-maternels. Le transfert des nutriments (glucose, lactate, corps cétoniques, acides aminés, acides gras, eau, vitamines, minéraux), des gaz respiratoires (oxygène, CO₂) ou d'autres composés (IgG, stéroïdes, nucléotides etc) se fait via le placenta. Ce transfert se produit au niveau des cellules syncytiotrophoblastiques des villosités où les substances passent de la membrane apicale (à côté du sang maternel) à la membrane basale (à côté des capillaires fœtaux). Le passage peut se faire par diffusion simple dans les deux sens et dépend du gradient de concentration entre le sang maternel et le sang fœtal. Ce type de transport permet le passage de composés lipophiles tels que l'O₂ et le CO₂. Les substances hydrophiles, comme l'H₂O ou le mannitol diffusent par voie paracellulaire, via des pores. Le passage des nutriments permettant une croissance fœtale appropriée se fait quant à lui via des transporteurs exprimés au sein de la membrane apicale et basale. La régulation du transfert des nutriments par le placenta joue un rôle crucial dans la croissance fœtale (Sibley et al. 2010; Lager and Powell 2012).

Le transfert materno-fœtal du glucose se fait par diffusion facilitée au travers des « transporteurs » de protéine GLUTs. Le transport des acides aminés se fait par transport actif secondaire. Vingt transporteurs placentaires d'acides aminés

différents ont été identifiés jusqu'à présent (Lager and Powell 2012) permettant un transfert d'acides aminés depuis le compartiment maternel vers le compartiment fœtal. Le transport des acides gras libres fait intervenir des protéines de liaison membranaires et cytoplasmiques et a aussi un impact sur la croissance fœtale. Grâce à l'action des lipases placentaires situées au sein de la membrane basale du compartiment maternel, les acides gras libres sont transportés vers le fœtus. Ce transport est par exemple augmenté en cas d'obésité maternelle ou de diabète (Gauster et al. 2011). Le transfert des nutriments vers le fœtus est régulé en fonction de la concentration maternelle en nutriments et de la densité des transporteurs exprimés au sein du placenta. Il est également dépendant de l'utilisation des nutriments par le placenta afin de satisfaire ses propres besoins en énergie.

Le placenta joue également un rôle de barrière protégeant le fœtus de certaines substances toxiques présentes dans le compartiment maternel et permet d'éliminer les déchets depuis le fœtus vers le compartiment maternel.

La fonction endocrine du placenta reflétée par sa capacité à synthétiser des hormones et autres médiateurs est une des autres fonctions cruciales du placenta pouvant avoir un impact sur le développement fœtal. Les hormones sécrétées par le placenta telles que l'HCG, la progestérone, l'oestradiol et l'oestriol sont importantes pour l'initiation et le maintien de la grossesse, puisqu'elles interviennent dans la régulation de la décidualisation, du développement placentaire, de l'angiogenèse, de la réceptivité de l'endomètre ou encore de l'implantation de l'embryon. L'hormone lactogène placentaire (hPL) et l'hormone de croissance placentaire (hPGH) jouent elles un rôle dans la résistance à l'insuline observée durant la grossesse et interviennent dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique maternel.

En résumé, le placenta joue un rôle crucial dans le transfert des nutriments vers le fœtus. Ce dernier est finement régulé par de nombreux facteurs, qu'ils soient maternels, intrinsèques au fonctionnement hormonal du placenta ou encore fœtaux. L'exposition maternelle à des facteurs environnementaux peut interagir avec ces mécanismes de régulation de l'homéostasie placentaire et fœtale et ainsi avoir des répercussions sur le développement fœtal et de là des effets à long terme sur la santé de l'individu.

4.3 Effets du BPA et du BPS au niveau du placenta

Nous allons décrire dans ce chapitre les études animales et humaines démontrant les effets du BPA et du BPS sur l'épigénome et le transcriptome placentaire. Enfin, nous décrivons les altérations morphologiques placentaires observées après exposition au BPA et au BPS.

4.3.1 *Effets du BPA et du BPS sur l'épigénome et le transcriptome placentaire*

Une des premières études à avoir caractérisé les effets possibles du BPA sur le placenta a mis en évidence des effets différents selon le sexe sur l'expression de certains récepteurs nucléaires au sein du placenta murin après exposition gestationnelle au BPA (2µg/kg/jour) (Imanishi et al. 2003). L'expression du récepteur aux œstrogènes (Esr beta) et du liver X récepteur est par exemple augmentée au sein des placentas mâles après exposition au BPA, tandis que l'ARNm de ces deux récepteurs n'était pas détecté au sein des placentas femelles. L'expression du récepteur à la progestérone était affectée de façon opposée selon le sexe puisqu'elle était augmentée au sein des placentas mâles tandis qu'elle était diminuée au sein des placentas femelles. En plus des effets différents selon le sexe du BPA sur l'expression de certains récepteurs nucléaires au sein du placenta murin, cette étude précurseuse a également mis en évidence des changements dans l'expression de protéines non récepteurs. Par exemple, le BPA diminue l'expression de l'alpha-foetoprotéine au sein du placenta, et ce dans les deux sexes. Au vu de la

forte affinité de l'alpha-foetoprotéine pour les oestrogènes et de sa régulation des effets des oestrogènes sur le développement du cerveau (Bakker et al. 2006), une diminution au sein du placenta peut impacter la quantité d'oestrogènes qui atteint le fœtus et ainsi régule son développement.

Les gènes soumis à empreinte constituent de bons candidats pour l'étude des effets du BPA sur le placenta puisque ces derniers jouent un rôle capital au cours du développement embryonnaire, placentaire ou encore postnatal (Kelsey 2007). Une étude a montré que l'administration de BPA par gavage (de e8.5 à e12.5, BPA 0.2 mg/kg/j) altère l'expression placentaire du transcrit *Rtl1*, un locus soumis à empreinte (Kang et al. 2011). Or, une délétion ou une production excessive de ce transcrit entraîne la mort *in utero* ou en période postnatale chez la souris (Sekita et al. 2008). Une autre étude a investigué les effets de l'exposition précoce (depuis 2 semaines avant la gestation jusqu'à e9.5 de gestation) à deux doses de BPA (10 mg/kg/j et 10 µg/kg/j) sur les gènes soumis à empreinte au niveau du chromosome 7 chez la souris. L'exposition au BPA à haute dose est associée à une augmentation de l'expression des 2 allèles des gènes normalement soumis à empreinte que sont *Snrpn*, *Igf2* and *Kcnq1ot1* au sein du placenta. Les modifications d'expression de *Snrpn* étaient associées à une diminution de la méthylation de l'ADN au sein de l'allèle maternel, normalement hyperméthylé et donc réprimé (Susiarjo et al. 2013). La faible dose de BPA avait le même effet sur les gènes *Snrpn* et *Igf2*. De façon intéressante, cette perte d'empreinte était spécifique au placenta puisque ces effets n'étaient pas retrouvés au sein des tissus embryonnaires tels que le cœur, le foie, le cerveau et le rein. De plus, l'exposition à la même dose de BPA lorsqu'elle survient plus tard dans le développement (e5.5 à e12.5) n'a pas d'impact sur l'expression des gènes soumis à empreinte (Susiarjo et al. 2013).

D'autres études ont étudié les modifications de transcription d'autres gènes que ceux soumis à empreinte au sein du placenta après exposition au BPA et au BPS. Tait *et al* ont mis en évidence que l'exposition à deux doses élevées de BPA (50

mg/kg/j et 0.5 mg/kg/j) en début de gestation modifiait l'expression de différents gènes avec parfois des effets opposés, notamment sur l'expression des gènes impliqués dans le développement et le remodelage des vaisseaux sanguins placentaires (Tait et al. 2015).

Quelques études humaines ont tenté d'établir un lien entre l'épigénome placentaire et/ou le transcriptome placentaire et l'exposition maternelle au BPA. Dans la cohorte de Shanghai-Minhang, l'exposition prénatale à des taux plus élevés de BPA (supérieurs au 75^{ème} percentile des concentrations urinaires en BPA mesurés chez 146 mères entre la 12^{ème} et la 16^{ème} semaine de grossesse) est associée à une hyperméthylation de 127 CpG et à une hypométhylation de 155 CpG au niveau du placenta (Song et al. 2021). Une autre étude réalisée sur 12 placentas obtenus après interruption volontaire de grossesse (2^{ème} trimestre) a mis en évidence une corrélation positive entre les concentrations placentaires en BPA libre et la méthylation de *LINE1* au sein du placenta (Nahar et al. 2015). Une autre étude a montré une corrélation entre les concentrations en BPA mesurées au niveau du sang de cordon et l'expression de l'ARNm du gène de la leptine et de son récepteur au niveau du placenta (Xu et al. 2015). Ces modifications d'expression n'étaient cependant pas corrélées avec des changements de la croissance fœtale.

4.3.2 Effets du BPA et du BPS sur la morphologie placentaire

Plusieurs études ont caractérisé les effets de l'exposition au BPA sur la morphologie du placenta murin. L'injection sous-cutanée d'une forte dose de BPA (10 mg/kg/j) en début de gestation (GD0 à GD7) réduit la surface de la zone labyrinthique et entraîne une dégénérescence des cellules géantes trophoblastiques et de la couche spongiotrophoblastique au sein des placentas collectés au 10^{ème} et 12^{ème} jour de grossesse (Tachibana et al. 2007). De façon assez similaire, l'exposition par voie orale à une plus forte dose de BPA (50 mg/kg/j) (GD0 à GD11) réduit la surface de la couche spongiotrophoblastique et entraîne une

dégénérescence et une nécrose des cellules géantes ainsi qu'une vacuolisation plus importante au sein de la zone jonctionnelle associée à une déplétion des cellules à glycogène (Tait et al. 2015). La morphologie des vaisseaux sanguins maternels et fœtaux est également altérée. Une exposition précoce à des doses plus faibles de BPA (200 µg/kg/j, depuis 2 semaines avant la gestation jusqu'à e12.5) réduit le rapport entre la surface de la zone spongiotrophoblastiques et celle des cellules géantes trophoblastiques (Mao et al. 2020). Ces altérations histologiques étaient semblables après la même exposition au BPS (Mao et al. 2020). L'administration par gavage de 50 µg/kg/j de BPA en début de gestation (GD1 à GD7) altère le remodelage de la paroi des artères utérines spiralées (Müller et al. 2018). Ces anomalies vasculaires étaient associées à une restriction de croissance fœtale observée chez les fœtus exposés *in utero* au BPA (Müller et al. 2018). Ces altérations morphologiques sont en rapport avec des modifications dans l'expression des gènes ou dans l'activité des protéines régulant la prolifération, la migration, l'invasion, la fusion et l'apoptose des trophoblastes (Adu-Gyamfi et al, 2022). *Ascl2* (*achaete-scute complex homolog 2*) constitue un potentiel médiateur des effets du BPA sur la morphologie du placenta. En effet, ce dernier joue un rôle clé dans la formation des différentes couches du placenta murin (Oh-McGinnis et al. 2011). Il s'agit d'un gène soumis à empreinte maternelle. Une exposition précoce à 10 mg/kg/j de BPA (2 semaines avant la conception jusqu'à e12.5) réduit la méthylation du génome entier au sein des placentas et entraîne une expression des deux allèles du gène *Ascl2* (Susiarjo et al. 2013). Ces modifications d'expression sont associées à une augmentation de la surface totale du placenta mais aussi une réduction du rapport entre la surface de la zone labyrinthique et la surface totale du placenta. La zone labyrinthique étant la surface qui abrite les échanges foeto-maternels au sein du placenta murin, ces modifications morphologiques pourraient impacter les échanges en oxygène et à terme affecter la vascularisation de la zone labyrinthique et potentiellement mener à un retard de croissance intra-utérin

(Susiarjo et al. 2013). Une autre étude n'a cependant pas montré de modification d'expression d'*Asc12* au sein des placentas murins exposés durant la même fenêtre d'exposition à une dose plus faible de BPA (200 µg/kg/j) (Mao et al. 2020). L'équipe de Ye *et al* a mis en évidence des modifications histologiques placentaires semblables à celles que l'on retrouve dans la pré-éclampsie après exposition gestationnelle au BPA (e7 à e17). La diminution de la perfusion placentaire était due à un défaut de remodelage des artères spiralées (Ye et al. 2019). En parallèle, l'expression de l'ARNm de *Wnt2*, un régulateur clé de la fonction trophoblastique, est diminuée en parallèle à une augmentation de la méthylation de son promoteur (Ye et al. 2019). Un autre groupe a démontré que l'exposition au BPA altère l'expression de certains transporteurs d'ions au sein de la zone labyrinthique du placenta, jouant un rôle dans le transport du calcium (*PMCA1*), du cuivre (*CTR1*, *ATP7A*) ou encore du fer (*HEPH*) (Lee et al. 2016).

Objectifs

Objectifs

Le contexte et la justification des recherches ont été énoncés au début de ce manuscrit.

L'objectif premier de notre travail était de confirmer dans un modèle murin que le placenta offre des biomarqueurs précoces épigénétiques des effets de l'exposition prénatale au BPA.

Dans cette première partie expérimentale, nous avons étudié les modifications de méthylation de l'ADN au sein du placenta murin après exposition au BPA durant la gestation. Afin d'étudier un effet potentiellement différent en fonction du sexe, nous avons étudié les modifications de méthylation de l'ADN au sein des placentas mâles et des placentas femelles. Nous avons ensuite étudié les modifications du transcriptome placentaire au sein des placentas femelles. Nous avons utilisé une haute dose de BPA (10 mg/kg/j) avec une exposition depuis le 6^{ème} jour de la gestation jusqu'au 18^{ème} jour de la gestation.

Voici les questions spécifiques qui ont guidé nos recherches pour cette première partie du travail :

- Quel est l'impact d'une exposition au BPA durant la gestation sur la méthylation de l'ADN au sein du placenta ?
- Est-ce que les altérations épigénétiques induites par le BPA au sein du placenta sont différentes selon le sexe ?
- Quel est l'impact d'une exposition au BPA durant la gestation sur le transcriptome placentaire ?

Le deuxième objectif de notre travail était d'étudier les biomarqueurs précoces placentaires des effets de l'exposition prénatale au BPA et au BPS à doses faibles et de les corrélérer à la croissance fœtale. La croissance postnatale et le timing pubertaire ont également été étudiés après exposition prénatale et durant la lactation au BPS.

Dans cette deuxième partie expérimentale, nous avons étudié les modifications du profil de transcription au sein du placenta murin après exposition au BPA et au BPS depuis 1 semaine avant la conception et durant la gestation. Nous avons étudié deux doses de BPA et de BPS : 4 µg/kg/j, l'exposition journalière considérée, au moment de l'étude, sans danger par l'agence européenne de sécurité et 25 ng/kg/j, une dose d'exposition environnementale très basse mais qui a un effet sur le contrôle hypothalamique du timing pubertaire (Franssen et al. 2016). Le profil de méthylation de l'ADN au sein des gènes cibles a également été étudié. La croissance et le timing pubertaire ont été étudiés chez les animaux exposés depuis une semaine avant la gestation jusqu'à la fin de la lactation au BPS.

Voici les questions spécifiques qui ont guidé nos recherches pour cette deuxième partie du travail :

- Quel est l'impact d'une exposition environnementale au BPA et au BPS sur le transcriptome placentaire ?
- Des modifications de méthylation de l'ADN peuvent-elles expliquer les modifications d'expression de certains gènes cibles ?
- Les modifications transcriptionnelles observées peuvent-elles être corrélées à des altérations de la fonction placentaire ?
- Quel est l'impact d'une exposition prénatale et durant la lactation à une très faible dose de BPS sur la croissance postnatale et le timing pubertaire ?

Résultats

Section 1

Effets différents selon le sexe d'une exposition prénatale à une forte dose de BPA sur l'épigénome et le transcriptome placentaire

Résumé

Le fœtus et le nourrisson sont particulièrement vulnérables aux effets des perturbateurs endocriniens (PEs). Chez le rongeur comme chez l'humain, une exposition prénatale aux PEs est associée à des altérations du contrôle de la balance énergétique et de la reproduction qui peuvent se manifester plus tardivement dans la vie. Cependant, à ce jour, il n'existe pas de biomarqueurs précoces des effets de l'exposition aux PEs. Notre projet a pour but d'identifier chez le rat les modifications épigénétiques liées à une exposition gestationnelle au Bisphénol A (BPA), un PE largement répandu. Les effets du BPA sur la méthylation de l'ADN ont été étudiés au niveau du placenta, organe situé à l'interface entre le fœtus et son environnement. L'exposition depuis le 6^{ème} jour de gestation jusqu'au 18^{ème} jour de gestation à 10 mg/kg/jour de BPA est associée à une augmentation de la méthylation de gènes spécifiques au sein du placenta avec un effet différent selon le sexe (*SF-1*; *Hmx2*; *Tctn2* et *Mamdc4* au sein des placentas femelles et *Tnks2* au sein des placentas mâles). L'expression des enzymes de régulation de la méthylation de l'ADN est elle aussi affectée différemment selon le sexe : l'expression de la DNA méthyltransférase de type 3a (DNMT3a) est augmentée uniquement au sein des placentas mâles. L'exposition au BPA n'a pas d'effet sur l'expression de DNMT1 dans aucun des deux sexes. Au sein des placentas femelles, une analyse transcriptomique a permis d'identifier une modification de l'expression d'ARNm de gènes impliqués dans la fonction et l'angiogenèse placentaire (*ROBO2*, *Lgals7* et *S100b*). Ces résultats indiquent que le placenta est le siège de modifications transcriptionnelles et épigénétiques après l'exposition aux PEs qui pourraient être utilisés comme biomarqueurs. Ces marqueurs semblent être différents en fonction du sexe fœtal.

Mots-clés

Bisphénol A, placenta, méthylation de l'ADN, transcription, programmation

Introduction

La vie fœtale et postnatale précoce apparaît comme une période critique par rapport aux effets de l'exposition aux PE. En modifiant l'environnement hormonal périnatal, ces derniers peuvent avoir un impact sur la mise en place des processus homéostatiques qui vont réguler le contrôle de la balance énergétique et le contrôle de la reproduction tout au long de la vie (Fudvoye et al. 2014). Nous avons vu dans l'introduction que les marques épigénétiques sont influencées par l'environnement dans lequel évolue le fœtus. Ils constituent donc un lien possible entre l'environnement périnatal et les effets de ce dernier au long cours. De plus en plus d'études ont montré que l'exposition aux PE pouvait affecter la méthylation de l'ADN : grâce à un modèle de souris dont la couleur du pelage varie en réponse à des modifications de la méthylation de l'ADN, Dolinoy *et al* ont mis en évidence des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau du génome de la descendance de femelles exposées au BPA durant la gestation et durant la lactation (Dolinoy et al. 2007). Chez l'humain, une étude épidémiologique menée chez des adolescentes prépubères a permis de montrer que des taux urinaires élevés de BPA étaient associés à une diminution de la méthylation de certains gènes impliqués dans les fonctions immunes, les activités de transport, le métabolisme et l'activité caspase. La méthylation de l'ADN était étudiée sur de l'ADN extrait à partir d'un prélèvement salivaire (cellules épithéliales) (Kim et al. 2013). D'autres études réalisées chez l'animal ont mis en évidence des effets du BPA sur la méthylation de gènes spécifiques au sein d'organes tels que l'utérus (Bromer et al. 2010), le testicule (Doshi et al. 2011) ou la prostate (W. Tang et al. 2012) qui pourraient expliquer les variations de l'expression de certains gènes dans ces tissus et les manifestations observées plus tard dans la vie

Situé à l'interface materno-fœtale, le placenta est un organe complexe qui assure notamment des fonctions d'échanges nutritionnels, endocrines et immunologiques. Il est en contact direct avec l'environnement maternel et apparaît

comme un « senseur » de l'environnement fœtal et joue donc un rôle crucial dans la programmation fœtale. L'exposition aux PEs peut altérer la fonction placentaire, souvent à travers l'implication de mécanismes épigénétiques (Gingrich et al. 2020). Une étude chez la souris a par exemple démontré que l'exposition prénatale au BPA altère la méthylation de gènes candidats au niveau du placenta de souris (Susiarjo et al. 2013).

Même si la vie fœtale et postnatale précoce apparaît comme une « fenêtre de susceptibilité accrue » par rapport aux effets des PEs, la latence variable et parfois très longue entre cette exposition précoce et les effets au long cours sur la santé rend difficile l'établissement d'un lien causal. Par conséquent, la mise en place de stratégie de prévention de l'exposition prénatale aux PEs dépend de la mise en évidence de biomarqueurs précoces des effets des PEs.

Le premier objectif de notre travail est d'évaluer si le placenta peut offrir des marqueurs épigénétiques précoces de l'exposition prénatale aux PEs.

Nous avons étudié les effets du BPA (10 mg/kg/j) sur la méthylation de l'ADN au sein du placenta après exposition à ce PE du 6^{ème} jour de gestation au 18^{ème} jour de gestation.

Nous avons choisi d'étudier les effets de l'exposition au BPA car c'est un composé chimique de synthèse largement utilisé et qu'il est détecté dans les urines de plus de 95% de la population américaine (Vandenberg et al. 2012) et 90% de la population belge (Pirard et al. 2012), ainsi que dans le liquide amniotique et dans le sang de cordon (Geens et al. 2012). Il a des effets suspectés à la fois sur le contrôle de la balance énergétique (syndrome métabolique, diabète,...) et sur le contrôle de la reproduction (modification du timing pubertaire, syndrome des ovaires micro polykystiques, hypofertilité ...) (Gore et al. 2015). Plusieurs études ont rapporté que l'exposition développementale au BPA était capable d'affecter la méthylation de l'ADN au sein de la descendance (Mileva et al. 2014; Alonso-Magdalena et al. 2016;

Singh and Li 2012). Nous avons choisi la dose de 10 mg/kg/j, largement supérieure à la dose définie par l'EFSA comme dose journalière tolérable (4 µg/kg/j) car cette dose avait été utilisée dans l'étude de Dolinoy (Dolinoy et al. 2007), une des premières à avoir étudié les effets de l'exposition gestationnelle au BPA sur la méthylation de l'ADN. Cette dose correspond au double de la NOAEL (no observed adverse effect level).

Plusieurs études ont suggéré que les PE pouvaient induire des effets différents selon le sexe à travers des modifications épigénétiques spécifiques à chaque sexe (McCabe et al. 2017; Kundakovic et al. 2013). Afin d'étudier un effet différent selon le sexe après exposition au BPA, nous avons étudié les modifications de méthylation de l'ADN au sein des placentas mâles et des placentas femelles. Les modifications d'expression des enzymes régulant la méthylation de l'ADN ont également été étudiées au sein des placentas mâles et femelles. Les modifications de l'expression de gènes placentaires après exposition au BPA ont été étudiées au sein des placentas femelles, chez qui les modifications épigénétiques étaient les plus marquées.

Matériel et méthodes

Exposition

Les rats femelles gestantes Wistar étaient logées dans des conditions standards d'animalerie, soit une température de 22,8°C et un cycle de jour de 7h à 19h. Pour écarter une exposition non contrôlée aux perturbateurs endocriniens testés, les animaux étaient logés dans des cages sans BPA et sans phyto-oestrogènes (Cage polypropylène, Ref 1291H006, Tecnilab, Pays-Bas) et l'eau de boisson est fournie dans des biberons en verre.

A partir du 6^{ème} jour de gestation jusqu'au 18^{ème} jour de gestation, les rats femelles gestantes (6 animaux par groupe) ont été exposées oralement à 10 mg/kg/j de BPA (dilué dans l'huile de maïs et ajouté à une galette) ou à l'huile de

mais seule. Les cages étaient vérifiées systématiquement après 10 minutes pour s'assurer de l'ingestion complète de la galette. Les femelles étaient pesées toutes les semaines afin d'adapter le dosage des solutions de BPA en fonction de la prise de poids. Au 19^{ème} jour, les femelles gestantes étaient sacrifiées et les placentas étaient prélevés par césarienne afin d'éviter les modifications épigénétiques potentiellement liées à la mise en travail spontanée. La position de chaque sac gestationnel était notée. Un morceau de tissu fœtal était collecté pour déterminer le « sexe du placenta » par PCR classique. L'entièreté du placenta (face maternelle et fœtale) était congelée dans de l'azote liquide avant d'en extraire l'ARN et l'ADN.

Détermination du sexe

Pour déterminer le sexe de chaque placenta, l'ADN était extrait à partir d'un morceau de tissu fœtal (kit DNeasy Blood & Tissue Kit) (Catalogue #69504; Qiagen, Gaithersburg, MD). À la suite de l'extraction de l'ADN, une étude de l'expression du gène SRY par PCR est réalisée, suivant le protocole du kit PROMEGA ((PROMEGA®, Wisconsin, USA). Pour se faire un couple de primer du gène SRY (sens : 5'GGAGAGAGGCGCAAGTTGGCT3' ; antisens : 5'GCTATGGTGCAGGGTCGCTCA3') est utilisé. 2µL d'ADN est ajouté à 48µL d'un mix composé (pour un échantillon) de 0.25µL de Taq, 1µL de nucléotides, 10µL de buffer, 2µL de primer sens et antisens ainsi que 33,75µL d'H₂O. Les échantillons sont ensuite soumis à une PCR via le Labcycler (Sensoquest GmbH, Göttingen, Allemagne) suivant un programme de 5min à 94°C puis 35 cycles de 45sec à 95°C, 45sec à 60°C et 1min à 72°C, pour terminer par une phase de 7min à 72°C. Les gels sont élaborés avec 100mL de TBE 1x et 2% d'agarose auquel on ajoute 10µL de midori green. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le SmartLadder SFTM (Eurogentec, Seraing, Belgique, ref. MW-1800-02). Les contrôles (un mâle et une femelle) proviennent d'un échantillon de bout de queue de rat adulte ayant subi les mêmes transformations que décrites précédemment.

Extraction de l'ADN et méthylation de l'ADN

L'ADN génomique est extrait des placentas mâles et femelles en utilisant le kit d'extraction d'ADN QIAGEN (Blood & Cell culture DNA Midi Kit (25) Ca.No. 13343). La concentration et la pureté de l'ADN sont déterminées par dosage spectrophotométrique (Nanodrop).

La méthylation de l'ADN des placentas (4 mâles et 4 femelles) a été étudiée grâce à la technique d'immuno-précipitation de l'ADN méthylé suivie d'une hybridation sur un microarray génome entier de rat (Gebhard et al. 2006). En résumé, l'ADN génomique est d'abord fragmenté par ultrasonication grâce au Bioruptor PICO (Diagenode). Le degré de fragmentation de l'ADN est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose et la concentration de l'ADN est mesurée par dosage spectrophotométrique (Nanodrop). L'ADN méthylé est ensuite immunoprécipité avec une protéine recombinante MBD2 (Methyl CpG binding domain 2) en utilisant le kit MethylCap™ (MBD from MeCP2) (Diagenode AF-100-0048, Liège, Belgium). Des gradients de concentrations croissantes en NaCl sont ensuite appliqués pour isoler l'ADN le plus riche en CpG méthylé. Ce dernier est ensuite purifié en utilisant le kit MinElute Reaction Cleanup (Qiagen 28204). Le labeling et l'hybridisation de l'ADN immunoprécipité se fait en suivant le protocole fourni par Agilent Technology (Agilent Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation Protocol) avec quelques modifications. Brièvement, l'ADN immunoprécipité provenant des placentas contrôles ou exposés au BPA a été marqué avec respectivement le Cy5-dUTP et le Cy3-dUTP, en utilisant le kit BioPrime® Total Genomic Labeling System (Invitrogen; Catalog Number 18097-011). L'ADN immunoprécipité fluorescent est ensuite hybridé sur une lame de microarray (4 femelles par groupe et 4 mâles par groupe ont été hybridés sur 8 lames de microarray différentes) (Agilent- G4498A Rat CpG Island CHIP-on-Chip Microarray 2x105K). Les lames de microarray sont ensuite scannées et les données extraites à l'aide du logiciel *Agilent Feature Extraction Software*. Pour l'analyse des

données, les lectures ont été alignées puis les gènes dont la méthylation était significativement modifiée entre les 2 conditions de traitement (*adjusted p-value*, c'est-à-dire valeur p corrigée de 0,05) ont été identifiés. Les données sont présentées en log₂ fold change de sorte qu'une valeur positive est associée à un gain de méthylation tandis qu'une valeur négative signifie une diminution de la méthylation après exposition au BPA.

Extraction d'ARN, PCR en temps réel et séquençage de l'ARN

L'ARN est extrait des placentas femelles, en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen, Pays-Bas).

Pour la réalisation des PCR en temps réel, une reverse transcription (RT) est réalisée à l'aide protocole du kit Transcriptor FirstStrand cDNA Synthesis (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse). L'ADN complémentaire produit par la RT est dilué 10 fois. 4 µL d'échantillon est ajouté à 6 µL de mix (5µL de FastStart Universal SYBR® Green Master (Roche); 0.4 µL d'Eau nuclease free et 0.3 µL de primers sens et antisens). Les primers sont dessinés par Integrated DNA Technologie, Inc. (DNMT1 sens : 5'-TCG GAG CAG ATC GAG AAG GA – 3' et DNMT1 antisens : 5' GGC CAA GTT AGG ACA CCT CC-3'; DNMT3a sens: 5' CTT CTC TGA AGC CCT CGC AG -3' et DNMT3a antisens : 5' CCT GTT CCT CTC CTT CCT TTC G-3'). Le gène de référence utilisé est l'actine (sens : 5' CGC GAG TAC AAC CTT GC 3' et antisens: 5' ATA CCC ZACC ATC ACA CCC TG 3'). La qPCR est réalisée à l'aide du LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) en suivant les conditions suivantes : phase d'initialisation de 2 minutes à 50°C et 10 min à 95°C, puis 40 cycles de dénaturation suivant 15 sec à 95°C et enfin une élongation et collecte de données de 60s à 60°C. Les valeurs de CT (cycle threshold) sont obtenues sur la courbe d'amplification de chaque échantillon. Les échantillons sont disposés en triplicat afin de normaliser nos résultats. Les analyses statistiques sont alors réalisées sur une moyenne des Ct pour chaque gène cible au sein de chaque échantillon. L'analyse des résultats repose sur la méthode du $\Delta\Delta Ct$.

Une équation de Pfaffl est réalisée pour chaque gène testé afin de prendre en compte l'efficacité des couples de primers, seules les efficacités allant de 1.8 à 2.2 sont retenues.

Le séquençage de l'ARN a été réalisé sur de l'ARN total extrait des placentas femelles après exposition à l'huile de maïs (contrôle) ou au BPA (3 échantillons par groupe). La préparation des bibliothèques et le séquençage ont été réalisés par le GIGA Genomics (Université de Liège, Belgique). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée sur le Bioanalyser 2100 avec les puces RNA 6000 Nano, les scores RIN étaient de 8 pour tous les échantillons. Le kit Illumina Truseq stranded mRNA Sample Preparation a été utilisé pour préparer des bibliothèques à partir de 1 g d'ARN total. Les ARN poly-A ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de polyT et fragmentés chimiquement. Ils ont été utilisés comme matrice pour la synthèse du premier brin en présence d'hexamères aléatoires, suivie de la synthèse du second brin. Les extrémités de l'ADNc ont été adénylées aux extrémités 3' OH avant d'être ligaturées à des adaptateurs contenant les index. Enfin, les fragments de bibliothèque ligaturés aux adaptateurs ont été enrichis par PCR selon le protocole d'Illumina et purifiés avec des billes magnétiques Ampure XP. Les bibliothèques ont été validées sur la puce Bioanalyser DNA 1000 et quantifiées par qPCR avec le kit de quantification de bibliothèques KAPA. Le séquençage a été effectué sur Illumina NextSeq500. Pour l'analyse des données, les séquences adaptatrices ont été éliminées des fichiers Fastq. Les lectures ont été alignées avec Tophat 2.0.9 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index-.shtml>) sur le génome du rat. La suite Cufflinks 2.2.0 (<http://cole-trapnellab.github.io/cufflinks/manual/>) a été utilisée pour générer des valeurs de FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per million fragments mapped) et CuffDiff a été utilisé pour identifier les gènes significativement exprimés de manière différentielle entre les 2 conditions de traitement (qvalue, c'est-à-dire valeur p corrigée de 0,05). Les données sont présentées en log2 fold change de sorte qu'une valeur positive est associée à une

augmentation de l'expression tandis qu'une valeur négative signifie une diminution de l'expression du gène après exposition au BPA.

Résultats

L'exposition prénatale au BPA modifie la méthylation de l'ADN au sein du placenta différemment selon le sexe

L'approche génome entier a permis d'identifier 4 gènes qui apparaissent significativement hyperméthylés (*adjusted p-value* < 0.05) après exposition au BPA dans les placentas femelles: *SF-1* (log FC: 1,21); *Hmx2* (log FC: 1,36); *Tctn2* (log FC: 1,45) et *Mamdc4* (log FC: 1,14). Dans les placentas mâles, seul un gène était significativement hyperméthylé après exposition au BPA: *Tnks2* (log FC: 1,92). (Fig. 1). Ces résultats suggèrent que l'exposition prénatale au BPA modifie la méthylation d'un nombre limité de gènes placentaires de façon différente en fonction du sexe.

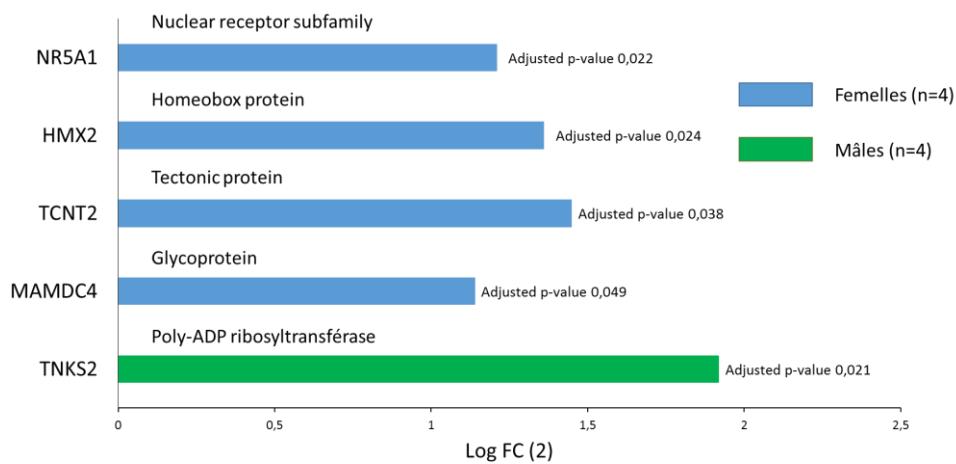


Figure 1 : Gènes dont la méthylation est significativement augmentée au sein des placentas femelles (bleu, n=4/groupe) et au sein des placentas mâles (vert, n=4/groupe) après exposition durant la gestation à 10 mg/kg/j de BPA, identifiés par immunoprécipitation de l'ADN méthylé suivie d'une hybridation sur un microarray génome entier de rat. Les résultats sont exprimés en log₂FC.

L'exposition prénatale au BPA modifie l'expression d'une enzyme régulant la méthylation de l'ADN au sein du placenta avec un effet différent selon le sexe

L'expression de l'ARNm codant pour DNMT3a, responsable de la méthylation *de novo*, était significativement plus élevée au sein des placentas mâles (Fig. 2A) mais non des placentas femelles (Fig. 2B) après exposition durant la gestation au BPA comparés aux contrôles.

Il n'y avait par contre pas d'effet de l'exposition durant la gestation au BPA sur l'expression de l'ARNm codant pour DNMT1 (responsable du maintien du profil de méthylation au cours des divisions cellulaires) que ce soit au sein des placentas mâles (Fig. 2C) ou femelles (Fig. 2D).

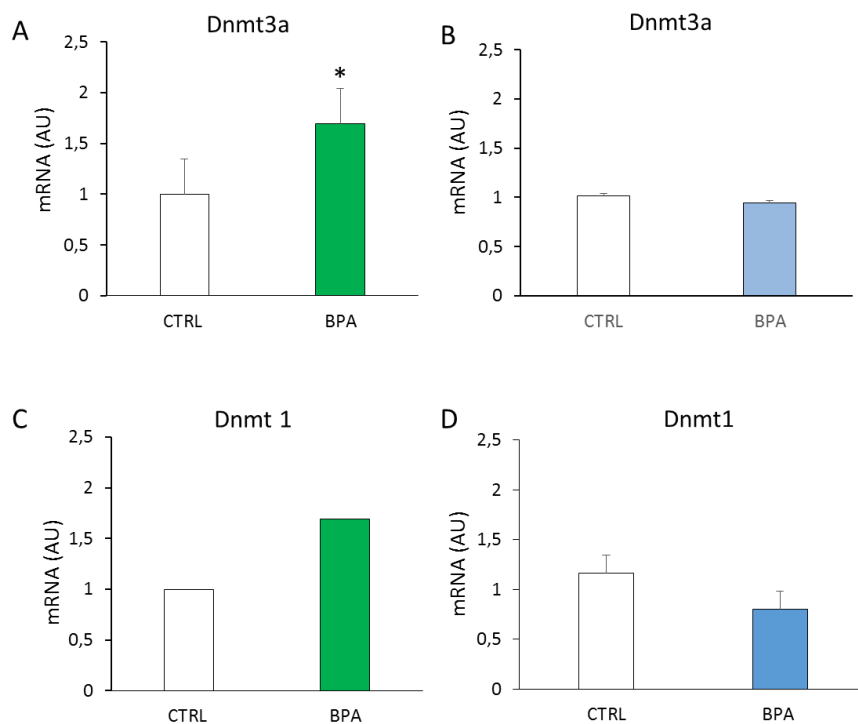


Figure 2 : Expression relative de l'ARNm de DNMT3 et de DNMT1 au sein des placentas mâles (A et C) et au sein des placentas femelles (B et D) après exposition gestationnelle au BPA 10 mg/kg/j, évaluée par PCR en temps réel (n=6/groupe). Les échantillons sont issus de 6 portées différentes * *p-value* < 0.05

L'exposition prénatale au BPA modifie l'expression du transcriptome au sein des placentas femelles

Etant donné que l'épigénome placentaire apparaissait plus sensible à l'effet du BPA chez les femelles, nous avons ensuite étudié l'expression d'ARNm au sein des placentas femelles après exposition au BPA.

L'analyse en composantes principales des données du RNA seq a mis en évidence une faible séparation entre les placentas femelles exposés à l'huile de maïs et au BPA 10 mg/kg/j sur base de l'expression de l'ARNm. De plus, on observe une grande dispersion entre les échantillons de placentas issus d'un même groupe (Fig. 3). L'exposition au BPA modifie de façon significative (*adjusted p-value* < 0.05) l'expression d'un nombre limité de gènes au sein des placentas femelles. Six gènes avaient une expression augmentée : *ROBO2* (log FC: 1,27); *Lgals7* (log FC: 1,5); *Svil* (log FC: 1,05); *Krt 42* (log FC: 1,35); *Dpt* (log FC: 1,33) et *Krt15* (log FC: 1,33) tandis que quatre avaient une expression diminuée après exposition au BPA : *Tagln* (log FC: -1,18); *S100b* (log FC: -1,23); *Tmem204* (log FC: -0.9) et *Arl4a* (log FC: -0.8). Le tableau I reprend ces différents gènes et leurs fonctions décrites au sein du placenta.

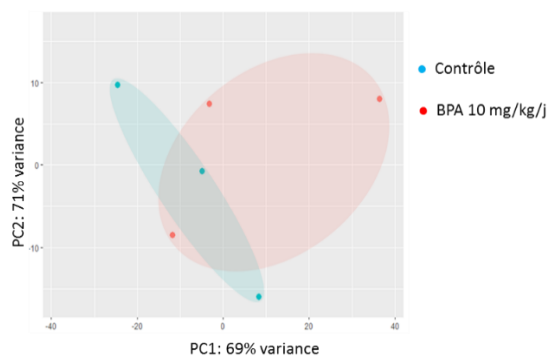


Figure 3 : Analyse en composantes principales (PCA) illustrant la dispersion du transcriptome des placentas femelles après exposition durant la gestation à l'huile de maïs ou au BPA 10 mg/kg/j (n=3/groupe). Chaque carré représente un échantillon individuel.

Tableau I : Gènes dont l'expression d'ARNm est significativement modifiée après exposition au BPA 10 mg/kg/jour au sein des placentas femelles comparés aux placentas contrôles

Symbole du Gène	Nom du gène	Reads	Log2 FC	Adj. p-value	Fonction
<i>Svil</i>	Supervillin	1027	1.05	0.0183	Réarrangement du cytosquelette d'actine
<i>Robo2</i>	Roundabout Guidance Receptor 2	168	1.27	0.0099	Guidage axonal Angiogenèse placentaire
<i>Krt15</i>	Keratin 15	223	1.32	0.0272	Vasculogenèse placentaire
<i>Dpt</i>	Dermatopontin	24	1.33	0.0243	Adhésion cellulaire lors de la placentation
<i>Krt42</i>	Keratin 42	47	1.34	0.0243	Vasculogenèse placentaire
<i>Lgals7</i>	Galectin 7	58	1.5	0.0123	Immunotolérance, Placentation
<i>Arl4a</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 4A	550	-0.79	0.0493	Réarrangement du cytosquelette d'actine
<i>Tmem204</i>	Transmembrane protein 204	389	-0.9	0.0239	Adhésion cellulaire
<i>Tagln</i>	Transgelin	891	-1.18	0.0099	Organisation du cytosquelette d'actine
<i>S100b</i>	S100 Calcium Binding Protein B	82	-1.22	0.0123	Adhésion embryonnaire, décidualisation, immunotolérance

Discussion

Grâce à notre modèle murin, nous avons étudié les effets de l'exposition prénatale au BPA sur l'épigénome placentaire, en étudiant les effets potentiellement différents selon le sexe. Nous avons formulé l'hypothèse, que le placenta, à l'interface entre la mère et le fœtus, pouvait être le siège de modifications de l'épigénome qui pourraient d'une part refléter les modifications épigénétiques présentes au sein des tissus fœtaux et d'autre part avoir des conséquences directes sur le développement et la fonction placentaire et ainsi avoir un impact sur le développement et la croissance fœtale.

Nous avons montré que l'exposition gestationnelle à une haute dose de BPA (10 mg/kg/j) a un impact sur le profil de méthylation de certains gènes au sein du placenta, et ce différemment en fonction du sexe. Une étude chez la souris a mis en évidence que l'exposition à la même dose de BPA depuis 2 semaines avant la conception jusqu'à e12.5 réduisait significativement le niveau de méthylation globale de l'ADN au sein du placenta murin (Susiarjo et al. 2013). Ces effets n'étaient pas observés après la même exposition à une faible dose de BPA (10 µg/kg/j) et n'étaient pas retrouvés au sein des tissus embryonnaires quelque soit la dose, reflétant la sensibilité de l'épigénome placentaire par rapport à l'exposition aux facteurs environnementaux. Une étude chez l'humain a par ailleurs montré une corrélation positive entre les concentrations placentaires de BPA et le niveau de méthylation globale au sein des placentas (basée sur l'assay LINE 1) (Nahar et al. 2015). Cette association n'était pas retrouvée au sein d'autres tissus périphériques (foie et rein), reflétant encore la possible sensibilité accrue de l'épigénome placentaire

Afin d'étudier les mécanismes pouvant expliquer les modifications de méthylation de l'ADN observées au sein des placentas, nous avons étudié l'expression des enzymes DNA méthyltransférases. L'expression de la DNMT 3a, responsable de la méthylation de novo, était augmentée après exposition au BPA au sein des placentas mâles tandis qu'il n'y avait pas d'effet au sein des placentas femelles. L'expression de DNMT1 n'était pas affectée dans les deux sexes. Sur base de ces résultats, il apparaît que le BPA modifie la méthylation de l'ADN en interférant avec d'autres cibles que l'expression des enzymes régulant la méthylation de l'ADN.

Les effets du BPA à la fois sur l'épigénome placentaire et sur l'expression des enzymes régulant la méthylation de l'ADN sont différents en fonction du sexe. Cela suggère une sensibilité différente à un même facteur environnemental en fonction du sexe et également une prédisposition différente de l'individu à développer

certaines pathologies. Cela met aussi en évidence l'importance de tenir compte du sexe dans les études des effets des PEs sur le placenta.

L'analyse du séquençage de l'ARN sur le génome entier a permis d'étudier le profil de transcription globale au sein des placentas femelles après exposition au BPA durant la gestation. Les résultats de notre étude ont mis en évidence un faible nombre de gènes significativement affectés par l'exposition à cette forte dose de BPA (10 mg/kg/j). Le faible nombre de gènes dont l'expression est affectée au sein du placenta par l'exposition au BPA est en accord avec l'étude de Mao *et al* qui a montré que l'exposition à 200 µg/kg/j de BPA depuis 2 semaines avant la conception jusqu'à e12.5 modifiait l'expression de 13 gènes au sein du placenta murin (Mao et al. 2020), sans qu'il n'y ait d'influence du sexe du placenta sur les effets transcriptomiques. L'étude de Tait *et al* a elle mis en évidence un grand nombre de gènes dont l'expression était modifiée au sein du placenta après exposition durant la gestation (GD1 à GD11) à deux doses de BPA : l'exposition à la faible dose (0.5 mg/kg/j) affectait l'expression de 582 gènes tandis que la dose la plus haute (50 mg/kg/j) affectait 701 gènes, avec 77 gènes en commun. L'analyse Gene Ontology a mis en évidence un enrichissement des termes « blood vessel/vasculature development » pour la faible dose et « nucleotide binding » pour la plus haute dose (Tait et al. 2015).

Parmi les gènes dont l'expression était significativement modifiée après exposition durant la gestation au BPA, plusieurs d'entre eux ont été identifiés comme potentiels marqueurs de développement d'une pré-éclampsie. En effet, la voie *SLIT-ROBO*, impliquée dans la régulation de l'angiogenèse placentaire et de la fonction trophoblastique apparaît modifiée dans les placentas de femmes enceintes présentant une pré-éclampsie comparativement aux placentas d'une population de femmes contrôles (Liao et al. 2012). On retrouve aussi des taux plus élevés de Galectin 7 dans le sérum collecté au 1er trimestre de la grossesse chez des femmes enceintes qui par la suite vont développer une pré-éclampsie

(Menkhorst et al. 2014). Chez la souris, l'administration durant la gestation de *Galectin 7* altère la formation du placenta (diminution de la surface de la zone de jonction et de la zone labyrinthique) et interfère avec le remodelage des artères spiralées suite à l'invasion trophoblastique (Menkhorst et al. 2020). Par ailleurs, l'expression protéique de *S100B* au sein des membranes amniotiques est plus élevée chez des femmes enceintes présentant une pré-éclampsie comparativement à une population contrôle (Tskitishvili et al. 2006). Chez l'humain, il a été démontré que les femmes enceintes présentant une pré-éclampsie avaient des taux sanguins de BPA plus élevés par rapport à une population contrôle (Ye et al. 2017). Ces différents gènes apparaissent donc comme des candidats biomarqueurs des effets du BPA sur le risque de développer une pré-éclampsie.

Conclusion et perspectives

Les données obtenues sur base de ce premier modèle expérimental soutiennent le rôle du placenta en tant que source de biomarqueurs précoces de l'exposition aux PEs.

La mise en perspective de notre modèle animal avec les données de la littérature nous a amenés à quelques réflexions concernant les différents choix d'expérimentation. Ces réflexions constitueront la base de la construction de notre deuxième modèle expérimental afin de répondre au deuxième objectif de ce travail qui est l'identification de marqueurs précoces placentaires des effets de l'exposition à des doses environnementales de BPA et de BPS et leurs effets sur le développement et la fonction du placenta et par là leurs effets sur le développement du fœtus et sa santé au long cours.

Fenêtre d'exposition :

En commençant l'exposition au BPA au 6^{ème} jour de gestation et en la poursuivant jusqu'à la fin de la grossesse (jour de la césarienne), notre exposition interfère avec la mise en place des marques épigénétiques qui surviennent au cours

de la différenciation cellulaire lors de l'organogenèse et lors des phases de croissance fœtale. Cette fenêtre d'exposition ne permet donc pas d'étudier les effets possibles d'une exposition au BPA sur la mise en place des marques épigénétiques qui a lieu au moment de la gamétogenèse et du développement précoce de l'embryon (Safi-Stibler and Gabory 2020). L'étude de Susiarjo (Susiarjo et al. 2013) a par exemple démontré l'absence d'effets de l'exposition au BPA sur les gènes soumis à empreinte au sein du placenta lorsque l'exposition commence à e5.5 comparativement aux effets observés lorsque cette dernière s'étend depuis 2 semaines avant la gestation. Par ailleurs, si l'on essaye de mimer une exposition environnementale au BPA, la femme enceinte est exposée de façon permanente au BPA et ce même avant la conception. Il est bien sûr compliqué de reproduire cette exposition plusieurs semaines avant la conception en conditions expérimentales notamment en terme logistique mais nous avons privilégié pour notre deuxième modèle animal, une exposition préalable à la conception et tout au long de la gestation afin d'une part d'être plus en accord avec l'exposition humaine au BPA et d'autre part d'étudier l'impact possible de l'exposition au BPA sur les deux grandes fenêtres de susceptibilité épigénétique que sont la gamétogenèse et l'organogenèse et le développement fœtal.

Doses et types de substances utilisées

La dose de 10 mg/kg/j a été choisie comme déjà expliqué en accord avec la dose utilisée dans le modèle de Dolinoy *et al* (Dolinoy et al. 2007) qui était un modèle précurseur par rapport aux effets du BPA sur la méthylation de l'ADN. L'exposition à cette dose correspond à une dose nettement supérieure à l'exposition journalière considérée sans danger par l'agence européenne de sécurité (4µg/kg/j) et au double de la NOAEL (5mg/kg/j). Ces « seuils de sécurité » ont été établis sans tenir compte que le BPA est une substance présentant des effets non monotones, et qu'il est donc impossible de définir des « seuils de sécurité ». Il est donc crucial de déterminer si non seulement cette dose « de sécurité » est réellement sans danger

sur la santé et si une dose inférieure à cette limite, de l'ordre du nanogramme, peut avoir des effets sur la santé. Cet ordre de dose correspond à l'exposition environnementale humaine au BPA estimée de 40 à 60 ng/kg/j (Bemrah et al. 2014; Geens et al. 2012).

Comme expliqué auparavant, le BPA a été choisi au vu de son caractère très ubiquitaire et des effets démontrés de l'exposition précoce au BPA sur la santé de l'individu au long cours, avec l'implication possible de mécanismes épigénétiques. Ces dernières années, des mesures restrictives concernant son utilisation ont été mises en place à la fois en Europe et aux Etats-Unis, avec en parallèle une utilisation croissante d'autres bisphénols, possédant des propriétés physico-chimiques semblables et qui pourraient avoir les mêmes propriétés toxiques. C'est le cas du BPS utilisé par exemple comme révélateur dans les papiers thermiques en remplacement du BPA. En dépit de l'augmentation rapide et exponentielle de son utilisation (le rapport de l'ECHA en 2018 a montré que le volume de BPS utilisé pour la fabrication de papiers thermiques a doublé entre 2016 et 2017), il existe peu d'information par rapport à ses effets possibles sur la santé. Nous avons donc choisi de comparer les effets de l'exposition environnementale au BPA sur le placenta avec les effets de la même exposition environnementale au BPS.

Références bibliographiques

- Alonso-Magdalená P, Rivera F, Guerrero-Bosagna C. 2016. Bisphenol-A and Metabolic Diseases: Epigenetic, Developmental and Transgenerational Basis. *Environmental Epigenetics* 2 (3): dww022. <https://doi.org/10.1093/eep/dww022>.
- Bemrah N, Jean J, Rivière G, Sanaa M, Leconte S, Bachelot M, et al. 2014. Assessment of Dietary Exposure to Bisphenol A in the French Population with a Special Focus on Risk Characterisation for Pregnant French Women. *Food and Chemical Toxicology*: 72 : 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.005>.
- Bromer J, Zhou Y, Taylor M, Doherty L, Taylor H. 2010. Bisphenol-A Exposure in Utero Leads to Epigenetic Alterations in the Developmental Programming of Uterine Estrogen Response. *FASEB Journal*: 24 (7): 2273-80. <https://doi.org/10.1096/fj.09-140533>.
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle R. 2007. Maternal Nutrient Supplementation Counteracts Bisphenol A-Induced DNA Hypomethylation in Early Development. *Proc Nat Acad Sci USA* : 104 (32): 13056-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703739104>.
- Doshi T, Mehta S, Dighe V, Balasinar N, Vanage G. 2011. Hypermethylation of Estrogen Receptor Promoter Region in Adult Testis of Rats Exposed Neonatally to Bisphenol A. *Toxicology* 289 (2-3): 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>.
- Fudvoye J, Bourguignon JP, Parent AS. 2014. Endocrine-Disrupting Chemicals and Human Growth and Maturation: A Focus on Early Critical Windows of Exposure. *Vitamins and Hormones* 94: 1-25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00001-8>.
- Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Schilling E, Klug M, Andreesen R, et al. 2006. Genome-Wide Profiling of CpG Methylation Identifies Novel Targets of Aberrant Hypermethylation in Myeloid Leukemia. *Cancer Research* 66 (12): 6118-28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0376>.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. 2012. A Review of Dietary and Non-Dietary Exposure to Bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*: 50 (10): 3725-40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>.
- Gingrich J, Ticiani E, Veiga-Lopez A. 2020. Placenta Disrupted: Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 31 (7): 508-24. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.03.003>.
- Gore, A., Chappell V, Fenton S, Flaws J, Nadal A, Prins G, et al. 2015. « EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals ». *Endocrine Reviews* 36 (6): E1-150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- Kim JH., Rozek L, Soliman A, Sartor M, Hablas A, Seifeldin I, et al. 2013. Bisphenol A-Associated Epigenomic Changes in Prepubescent Girls: A Cross-Sectional Study in Gharbiah, Egypt. *Environmental Health*: 12 : 33. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-33>.
- Kundakovic M, Gudsnuk K, Franks B, Madrid J, Miller R, Perera F, et al. 2013. Sex-Specific Epigenetic Disruption and Behavioral Changes Following Low-Dose in Utero Bisphenol A Exposure. *Proc Nat Acad Sci USA* : 110 (24): 9956-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214056110>.
- Liao WX, Laurent L, Agent S, Hodges J, Chen Db. 2012. Human Placental Expression of SLIT/ROBO Signaling Cues: Effects of Preeclampsia and Hypoxia. *Biology of Reproduction* 86 (4): 111. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088138>.

- Mao J, Jain A, Denslow N, Nouri MZ, Chen S, Wang T, et al. 2020. Bisphenol A and Bisphenol S Disruptions of the Mouse Placenta and Potential Effects on the Placenta-Brain Axis. *Proc Nat Acad Sci USA* : 117 (9): 4642-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.
- McCabe C, Anderson O, Montrose L, Neier K, Dolinoy D. 2017. Sexually Dimorphic Effects of Early-Life Exposures to Endocrine Disruptors: Sex-Specific Epigenetic Reprogramming as a Potential Mechanism. *Current Environmental Health Reports* 4 (4): 426-38. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0170-z>.
- Menkhorst E, Koga K, Van Sinderen M, Dimitriadis E. 2014. Galectin-7 Serum Levels Are Altered Prior to the Onset of Pre-Eclampsia. *Placenta* 35 (4): 281-85. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.009>.
- Menkhorst E, Zhou W, Santos L, Delforce S, So T, Rainczuk K, et al. 2020. Galectin-7 Impairs Placentation and Causes Preeclampsia Features in Mice. *Hypertension* 76 (4): 1185-94. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15313>.
- Mileva G, Baker S, Konkle A, Bielajew C. 2014. Bisphenol-A: Epigenetic Reprogramming and Effects on Reproduction and Behavior. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (7): 7537-61. <https://doi.org/10.3390/ijerph110707537>.
- Nahar M, Liao C, Kannan K, Harris C, Dolinoy D. 2015. In Utero Bisphenol A Concentration, Metabolism, and Global DNA Methylation across Matched Placenta, Kidney, and Liver in the Human Fetus. *Chemosphere* 124: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.071>.
- Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. 2012. Urinary Levels of Bisphenol A, Triclosan and 4-Nonylphenol in a General Belgian Population. *Environment International* 48: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.07.003>.
- Singh S, Li S. 2012. Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (8): 10143-53. <https://doi.org/10.3390/ijms130810143>.
- Safi-Stibler S, Gabory A. 2020. Epigenetics and the Developmental Origins of Health and Disease: Parental Environment Signalling to the Epigenome, Critical Time Windows and Sculpting the Adult Phenotype. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 97 : 172-80. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.09.008>.
- Susiarjo M, Sasson I, Mesaros M, Bartolomei M. 2013. Bisphenol a Exposure Disrupts Genomic Imprinting in the Mouse. *PLoS Genetics* 9 (4): e1003401. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003401>.
- Tait S, Tassinari R, Maranghi F, Mantovani A. 2015. Bisphenol A Affects Placental Layers Morphology and Angiogenesis during Early Pregnancy Phase in Mice. *Journal of Applied Toxicology*: 35 (11): 1278-91. <https://doi.org/10.1002/jat.3176>.
- Tskitishvili, E, Komoto Y, Temma-Asano K, Hayashi S, Kinugasa Y, Tsubouchi H, et al. 2006. S100B protein expression in the amnion and amniotic fluid in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Molecular Human Reproduction* 12 (12): 755-61. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal083>.
- Vandenberg L, Colborn T, Hayes T, Heindel J, Jacobs D, Lee DH, et al. 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 33 (3): 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>.

Résultats

Section 2

Effets de l'exposition prénatale à des doses environnementales de BPA et de BPS sur le transcriptome au sein des placentas femelles : implication de mécanismes épigénétiques et conséquences sur la placentation et la croissance fœtale

Abstract

Because of its possible adverse effects on human health and its ubiquitous nature, Bisphenol A (BPA) is gradually replaced by presumably safer alternative such as Bisphenol S (BPS). However, data regarding the effects of developmental exposure to BPS on pregnancy and fetal outcomes is very scarce. The aim of this study was to evaluate the effects of developmental exposure to a very low dose of BPS on pregnancy and fetal outcomes and to study whether transcriptional and epigenetic modifications at the level of the placenta could mediate those effects. We showed that perinatal exposure to BPS, even at a very low dose can significantly affect pregnancy and fetal outcomes and affect the placental transcriptome and epigenome. Exposure one week before mating to a very low dose of BPS (25 ng/kg/day) reduced mating success rate, while comparable dose of BPA did not affect this parameter. Exposure to this very low dose of BPS one week before mating and during gestation decreased placental expression of *Fut 2*, *Psg 22* and *Wnt7b* which are involved in early placental development. Placental DNA methylation and mRNA expression of steroid receptor coactivator 2 (*SRC2*), a key mediator of steroid response, were significantly reduced by exposure to the low dose of BPS. Exposure to this very low dose of BPS also led to lower weight of male and female offspring at GD18. This growth restriction persisted until adulthood in females but not males exposed one week before mating, during gestation and during lactation to BPS. These results suggest that early exposure to a very low dose of BPS impacts pregnancy outcomes through placental dysregulation.

Keywords

Bisphenol S, placenta, transcription, DNA methylation, Steroid receptor coactivator 2

Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDC) widely impact individuals and populations given their ubiquity in our environment (Gore et al. 2015). Developmental exposure to EDCs is associated with an increased risk of adult reproductive failure, cancer, obesity, metabolic syndrome, and neurodevelopmental disorders (Demeneix and Slama 2019). This led the World Health Organization, the United Nations and the International Council on Chemical Management to list them as an emerging public-health concern (WHO/UNEP 2013; Escriva et al. 2019). Among EDCs, Bisphenol A (BPA) is used for manufacturing polycarbonate plastics and epoxy resins, and is thus present in food cans and plastic containers (Rochester 2013). It is extremely ubiquitous as reflected by the presence of detectable amounts of urinary BPA in more than 90% of the US (Calafat et al. 2005; 2008) and European populations (Covaci et al. 2015). BPA is detected in pregnant women (Vandenberg et al. 2010) as well as human placenta and amniotic fluid (Engel et al. 2006; Schönfelder et al. 2002; Edlow et al. 2012; Ikezuki et al. 2002; Yamada et al. 2002), indicating fetal exposure. In the last decades, epidemiological studies as well as experimental models have reported a link between BPA exposure and female fertility (Pivonello et al. 2020). BPA exposure can impact several aspects of female reproductive functions, including uterine receptivity and embryo implantation (Li et al. 2016; Pan et al. 2015; Yuan et al. 2018). The possible adverse effects of BPA on human health and its ubiquitous nature have prompted the industry to remove BPA from consumer products and search for alternative chemicals, such as Bisphenol S (BPS). BPS has a chemical structure similar to BPA. Its physical properties make it attractive to progressively replace BPA in a variety of consumer products such as thermal paper and food containers (Wu et al. 2018). Therefore, environmental levels of BPS are continuously increasing as reflected by its presence in urinary samples of 81% of samples collected in the United States and seven Asian countries (Liao et al. 2012). In Europe, the Esteban cross-sectional study revealed that BPS

was detected in almost all urine samples of the French population (Balico et al. 2019). BPS has also been detected in human cord serum (Kolatorova et al. 2018; Li et al. 2020) suggesting placental transfer. However, the safety and lower toxicity of BSP compared to BPA remains to be proven (Chen et al. 2016; Wu et al. 2018). Recent studies indicate that developmental exposure to BPS could have similar or other adverse effects than BPA. Early exposure to BPS could affect both the control of energy metabolism (Meng et al. 2018; Meng et al. 2019), and reproduction (Kaimal et al. 2021). However, data regarding its effects on fetal development is still scarce.

The placenta, located at the interface between the mother and the fetus, plays a critical role in fetal homeostasis. Changes in its physiology trigger an adaptive response from the fetus and affect the programming of its future health. Its vulnerability to EDCs is at least partially explained by its high content in steroid hormone receptors (Gingrich et al. 2020). Exposure to BPA leads to changes both in placental morphology and function (Strakovsky and Schantz 2018; Vrooman et al. 2016). Recent data indicates that BPS (200 µg/kg/d) also affects placental transcriptome and histology (Mao et al. 2020). In sheep, gestational exposure to BPS was associated with impaired placental endocrine function while BPA exposure did not show any effect (Gingrich et al. 2018) suggesting the necessity to explore potential differential effects of both bisphenols.

Epigenetic mechanisms have been recently proposed as one of the missing links between early life insults and long term health outcomes. Placental epigenetic modifications mediate changes in placental gene expression and can be used as biomarkers of developmental exposure to environmental factors. Several studies have identified an association between maternal environmental factors (maternal nutrition, gestational diabetes), specific placental DNA methylation and subsequent neonatal and early childhood growth and development (Taniguchi et al. 2018; Tian et al. 2020). Most rodent studies have focused on the effects of BPA

on DNA methylation of specific genes involved in the development of fetal and maternal organs, including the brain and uterus (Bromer et al. 2010; Kundakovic et al. 2013) while the effects of environmental exposure to BPA or BPS on placental epigenetic mechanisms remain unknown. In this study, we characterized the effects of gestational and lactational exposure to an environmentally relevant dose of BPS (25 ng/kg/day) on growth and puberty in rats. Our goal was to identify transcriptional changes in the placenta after exposure to environmentally relevant doses of BPA or BPS (25 ng/kg/day) (Geens et al. 2012) This low dose of 25 ng/kg/day is consistent with current human exposure to BPA (0.01 to 0.1 µg/kg/day) (Geens et al. 2012). Such exposure was compared to the current tolerable daily intake dose of BPA as currently recommended by the European Food safety Authority (EFSA) (4 µg/kg/day). We studied placental transcriptome modifications using RNA sequencing. We further aimed at understanding the mechanisms underlying the effects of BPA and BPS on placental transcriptome by studying the placental expression of estrogen receptors and their main coactivators. DNA methylation pattern of specific placental biomarker was studied with bisulfite sequencing in parallel with mRNA expression of enzymes involved in regulation of DNA methylation using real-time PCR.

Material and methods

Animal care and exposure

All experiments were carried out with the approval of the Belgian Ministry of Agriculture and the Ethical Committee at the University of Liège.

Female Wistar rats were purchased from the University of Liège. They were housed in standardized conditions (22.8°C, lights on from 6.30 am to 6.30 pm). The animals were raised in BPA-free cages (Polypropylene cages, Ref 1291H006, Tecnilab, Netherlands) and fed EDC- and phytoestrogen-free chow (V135 R/Z low

phytoestrogen pellets, SSNIFF Diet, Netherlands). Water was supplied in glass bottles.

Female rats were exposed orally either to corn oil (n=25) or BPA 25 ng/kg/day (n=15), BPA 4 µg/kg/day (n=15) (Ref: 23, 9658; Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) or to BPS 25 ng/kg/day (n=25) or BPS 4 µg/kg/day (n=15). Daily exposure was done by injecting 50 µl of BPA or BPS or corn oil in a waffle given to each female. Cages were systematically verified after 10 minutes to check for complete ingestion. Females were randomly assigned to treatment. Females were weighed weekly, and volume of corn oil, BPA, or BPS injected into the wafer was adjusted accordingly. Females were exposed during 1 week before being paired with one male during 48h. That day was considered as gestational day 1 (GD1). Dams continued to be exposed daily to corn oil, BPA or BPS until gestational day 18 (GD18). Mating success rate was defined as the percentage of females giving birth after being paired with the male. Caesarian section was done on GD18. The position of each gestational sac was recorded. Fetal tissue was collected for PCR determination of sex. Whole placenta (maternal and fetal) was frozen in liquid nitrogen before DNA and RNA extraction.

In order to study the effects of BPS on early development, one group of dams continued to be orally exposed to BPS 25 ng/kg/day (n=4) or corn oil (n=4) until postnatal day 21 (PND21). Litters were homogenized for size and sex ratio on the first postnatal day of life to have 10 to 12 pups per litter and a 1:1 male/female ratio. Cross-fostering of a maximum of two pups per litter was used when homogenization was required. Day of birth was considered as PND 0. Pups were weaned on PND 21. Female and male pups were followed for weight gain. From PND 25, female rats were followed for vaginal opening and estrus cyclicity as described previously (Franssen et al. 2014; Toro et al. 2018). Briefly, females were examined daily by two experimenters for imperforation of the vaginal membrane to determine age at vaginal opening. Thereafter, estrus cyclicity was evaluated using vaginal smears taken every morning until PND 90. Regular cycles were defined

as a sequence of diestrus 1, diestrus 2, proestrus, and estrus in 4 consecutive days (Goldman et al. 2007). The percentage of females having a regular cycle were calculated for 21 days. Male rats were observed daily to determine the age for balano-preputial separation.

Sex determination

To determine the sex of each conceptus, DNA was isolated from fetal tissue using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Catalogue #69504; Qiagen, Gaithersburg, MD). Y-chromosome specific gene (forward primer: 5'GGAGAGAGGCGCAAGTTGGCT3'; reverse primer: 5'GCTATGGTGCAGGGTCGCTCA3') expression was studied using Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification. Once the sex of the foetus was established, female and male placenta systematically surrounded by two female and two male placentas respectively were selected from each litter for further analyses in order to limit variability in local uterine environment.

RNA sequencing

RNAseq analysis was carried out on total RNA extracted from a pool of placental tissues of female rats after prenatal exposure to vehicle, BPA (25 ng/kw/day and 4 µg/kg/day) or BPS (25 ng/kg/day and 4 µg/kg/day) (n=3/group). Specifically, placenta tissue from 2-3 embryos collected from different dams was extracted for total RNA. Thereafter, extracted placentas were pooled to obtain three samples per group.

Library preparation and sequencing were performed at the GIGA Genomics facility (University of Liège, Belgium). RNA integrity was verified on the Agilent Bioanalyser with RNA 6000 Nano chips, RIN scores were > 7.5 for all samples. Illumina Truseq stranded mRNA Sample Preparation kit was used to prepare libraries from 1 microgram of total RNA. Libraries were quantified by qPCR with the KAPA Library Quantification Kits for Illumina® platforms. Sequencing was performed on Illumina® NovaSeq™6000 Sequencing System. The average read-

depth of the data is ~25-30M reads. The data were processed through the nf-core "rnaseq" pipeline version 1.4.2 (<https://nf-co.re/rnaseq/1.4.2>). Quality control of the samples was assessed with FastQC software v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Reads were aligned on the Rattus Norvegicus genome, using Rnor_6.0 genome build and annotations from the Ensembl release v102 (ensembl.org) using STAR software v2.6.1d (<https://github.com/alexdobin/STAR>).

Following alignment, expression count data was normalized and fitted based on the binomial distribution and differential gene expression (DGE) analysis was performed using the R package DESeq2 (v1.32.0) (Love et al. 2014). A Principal Component Analysis (PCA) was carried out using the first 500 more variable features using the DESeq2 function "*VarianceStabilizingTransformation*". Using a p-value threshold of 0.05, differentially expressed genes for each comparison (i.e. BPA 25ng vs Ctl) were used as input for a Gene Ontology (GO) analysis using DAVID.

RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

Real-time Quantitative PCR (qPCR) analysis was used to assess mRNA levels of specific genes in placenta (n=6/groupe): *Esr1*, *Esr2*, *Src1*, *Src2*, *Src3*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1*, *Tet2* (see primer sequence at Table S1). Total RNA was extracted from female placenta using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Netherlands) following manufacturer's instructions. Five hundred nanograms of bulk mRNA for each sample were reverse transcribed using the Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche). For real-time quantitative PCR reactions, each sample cDNA was diluted 10-fold, and 4µL were added to a mix of 5µL FastStart Universal SYBR® Green Master (Roche), 0.4µL of nuclease-free water and 0.3µL of forward and reverse primer. Primers were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. qPCR was performed using a Quant Studio 12K Flex (Applied Biosystems) under the following conditions: initialization: 2 min at at 50°C, 10 min at at 95°C, followed by

40 cycles of denaturation: 15 sec at 95°C and elongation and data collection: 60 s at 60°C. Cycle threshold (Ct) values were obtained from each individual amplification curve, and the average Ct was calculated for each target gene in each sample. Quantification of relative gene expression was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method implemented with the Pfaffl equation, which takes into account reaction efficiency depending on primers (Pfaffl 2001). All assays had efficiencies between 1.9 and 2.1. β -actin was used as housekeeping gene.

DNA methylation and bisulfite sequencing

DNA from frozen male and female placenta was isolated using a Puregene DNA purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the supplier's recommendation. DNA concentration was determined with a spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware), and quality was assessed using an agarose gel.

Bisulfite modification-based genomic sequencing was used to establish a detailed mapping of the DNA methylation pattern of specific genes. Genomic bulk DNA from control and BPA/BPS placenta was bisulfite converted (BC), using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. BC DNA was used as input material for PCR amplification followed by library preparation and deep sequencing.

Primers were designed to amplify a region of the CPG island of the rat SRC2 (primer sequence at Table S1). Amplification was carried out on a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) with 20 ng of BC DNA per reaction. The amplification conditions were: 40 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 1 min. Sequencing libraries were prepared using the NETFLEX[®] DNA Sequencing Kit (BIOO Scientific) according to manufacturer's instructions. The libraries were evaluated using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and were normalized to 2 nM with 10 mM Tris-HCl. Libraries were then pooled and sequenced on a MiSeq (Illumina,

Inc.) by the GIGA Genomic platform to generate 250 base, paired-end reads. The reads were trimmed using Trim Galore (http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Trim_galore/) and aligned to the rat reference genome (Ensemble Rat Rnor_6) using Bismark (Krueger and Andrews 2011). Alignment data was converted to CpG methylation rate using the Bismark methylation extractor. Only reads with a >98% cytosine conversion and >98% alignment were used; no sample was excluded from the analysis. The CpG methylation rates were calculated as the ratio of methylated reads over the total number of reads. Methylation rates for CpGs with fewer than 10 reads were excluded from further analysis; samples had an average of 1,750 × read coverage.

Statistics

All statistical analyzes were performed using Prism (version 7.0, GraphPad). Data was subjected to a normality. Equal variance and parametric tests were used when conditions were fulfilled. Parametric test were one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls or Sidak’s for multiple comparisons; or Student’s t-test to compare two groups. When comparing percentages, groups were subjected to an arcsine transformation before statistical analysis to convert the values from a binomial to a normal distribution. Data that did not reach normality were analyzed using a Mann-Whitney test. When making multiple comparisons, α was adjusted using the Bonferroni correction. The investigator was blinded for all physiological and molecular determination.

Results

Developmental exposure to environmentally relevant dose of BPS impairs mating success rate and fetal growth

Dams were orally exposed to environmentally relevant doses of BPA or BPS (25 ng/kg/day) one week prior mating and during gestation (Fig.1). For comparison purpose, 2 groups were also exposed to doses of BPA or BPS corresponding to the tolerable daily intake of BPA (4 µg/kg/day) as defined by EFSA.

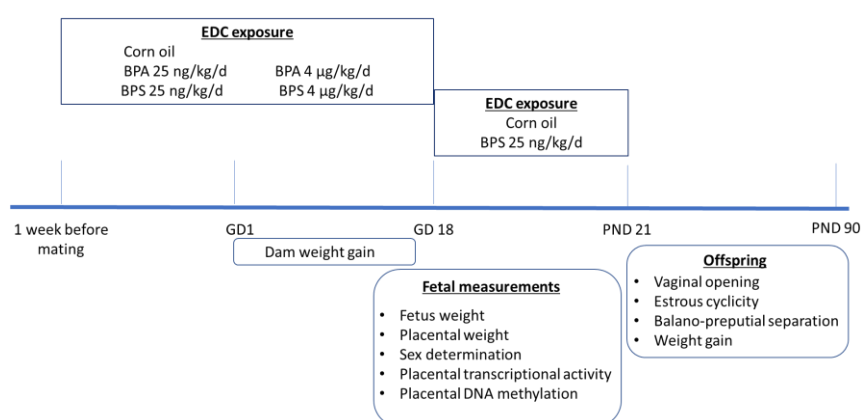


Figure 1: Experimental timeline

Adult female rats were orally exposed one week before mating and during gestation until GD18 to corn oil (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25), BPS 4 µg/kg/day (n=15), BPA 25 ng/kg/day (n=15) or BPA 4 µg/kg/day (n=15). Mating was carried out for period of 48h. Caesarian section was done on GD18. Offspring of female rats exposed to CTRL and BPS 25 ng/kg/day continued to be exposed to corn oil (n= 20) or to BPS 25 ng/kg/day (n= 23) during lactation until weaning on PND21.

Exposure to BPS 25 ng/kg/day and BPA 4 µg/kg/day led to a reduced mating success rate (respectively 52 and 53 %) compared to female rats exposed to corn oil (76%) (Fig. 2A). In contrast, mating success rate was not affected by exposure to BPS 4 µg/kg/day (73.33%) or BPA 25 ng/kg/day (80%).

Weight gain during pregnancy was comparable in all exposed and control groups (Fig. 2B). Neither BPA nor BPS affected litter size (Fig. 2C) or male-to-female ratio (Fig. 2D). However, female fetal growth was affected by gestational exposure to the

lowest doses of BPA and BPS as fetal weight (GD18) was significantly lower in animals developmentally exposed to BPS 25 ng or BPA 25 ng compared to controls (Fig. 3A). Placental weight was not affected in those 2 groups (Fig. 3B). Average fetal weight was higher in females developmentally exposed to BPA 4 µg/kg/day (Fig. 3A) and this weight gain was associated with higher placental weight (Fig. 3B).

Similarly, male fetal weight (GD18) was significantly lower in animals exposed to BPS 25 ng and BPA 25 ng compared to controls and average male fetal weight was significantly higher in males exposed to BPA 4 µg/kg/day (Fig. S1A). Male placental weight was higher in males developmentally exposed to BPA 4 µg/kg/day (Fig. S1B).

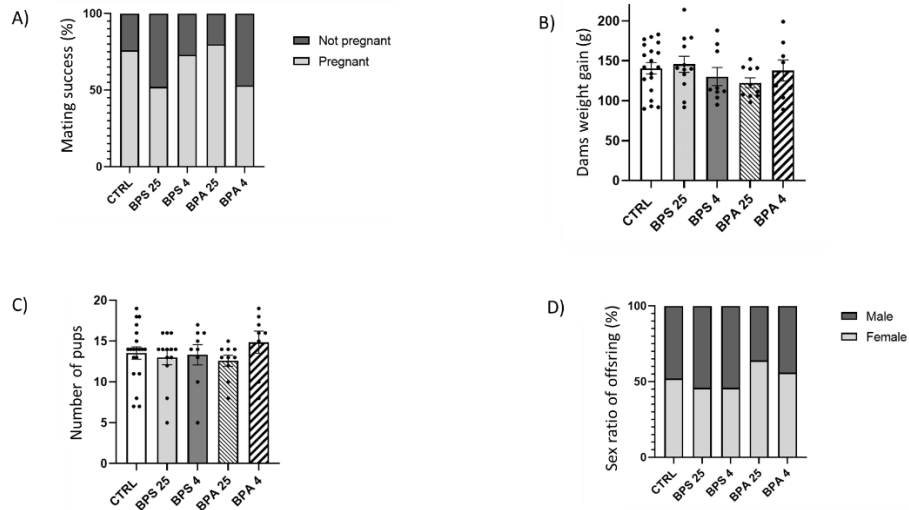


Figure 2. Pregnancy outcomes following exposure to vehicle, Bisphenol A or Bisphenol S

(A) Mating success rate (%) in female rat exposed to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 μ g/kg/day (n=15); BPA (25 ng/kg/day; n= 15) or BPA (4 μ g/kg/day; n=15). Chi-Square test.

(B) Average gestational weight until GD18 in dams exposed to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 μ g/kg/day (n=15); BPA (25 ng/kg/day; n= 15); BPA (4 μ g/kg/day; n=15). Data are presented as mean \pm SEM.

One way ANOVA. Error bars represent standard deviation.

(C) Average litter size at GD18 following exposure to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 μ g/kg/day (n=15); BPA 25 ng/kg/day (n= 15) or BPA 4 μ g/kg/day (n=15). Data are presented as mean \pm SEM.

One way ANOVA. Error bars represent standard deviation.

(D) Offspring sex ratio (%) following exposure to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 μ g/kg/day (n=15); BPA 25 ng/kg/day (n= 15) or BPA 4 μ g/kg/day (n=15).

Developmental exposure to environmentally relevant dose of BPS impairs female postnatal growth

Two subgroup of lactating dams were exposed to corn oil or BPS 25 ng/kg/day until weaning in order to study the effects of the lowest dose of BPS on postnatal development.

Postnatal female growth was affected by exposure to BPS 25 ng/kg/day as weight tended to be lower in BPS-exposed females compared to controls throughout development. This trend became significant on postnatal day 90 (Fig. 3C). Food intake did not significantly differ between control and BPS-exposed females (data not shown).

Average age at vaginal opening tended to be delayed in BPS 25 exposed females but this trend was not significant (Fig. 3D). Time-curve analysis similarly showed a non-significant trend to delayed vaginal opening in females exposed to BPS 25 ng (Fig. 3E). Estrus cyclicity was not affected by exposure to BPS 25ng (Fig. 3F).

Average weight of BPS-exposed males tended to be lower than controls throughout early development but this trend did not persist into adulthood (Fig. S1C). Food intake did not significantly differ between control and BPS-exposed males (data not shown). In males, age at balano-preputial separation was not affected by exposure to BPS 25 (Fig. S1D).

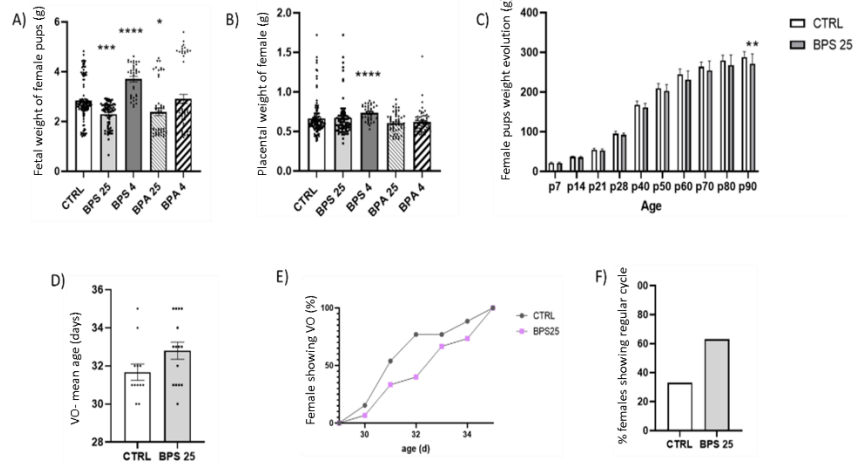


Figure 3: Female growth and pubertal outcomes following gestational and lactational exposure to BPS 25 ng/kg/day

(A) Average female offspring weight at GD18 following exposure to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 µg/kg/day (n=15); BPA 25 ng/kg/day (n=15) or BPA 4 µg/kg/day (n=15). Data are presented as mean ± SEM

* p-value : 0,0117 *** p value : 0,0003 **** p-value < 0,0001 one way ANOVA. Error bars represent standard deviation.

(B) Comparison of female placenta weight at GD18 following exposure to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 µg/kg/day (n=15); BPA 25 ng/kg/day (n=15) or BPA 4 µg/kg/day (n=15). Data are presented as mean ± SEM

**** p-value < 0,0001 one way ANOVA. Error bars represent standard deviation.

(C) Average weight evolution until postnatal day 90 in females exposed to corn oil (control) (n= 6) or BPS (25 ng/kg/day) (n= 8) during gestation and lactation. Data are presented as mean ± SEM.

** p-value: 0,003 Multiple unpaired t test

(D) Age at vaginal opening in female rats exposed during gestation and lactation to corn oil (control) (n=12) or BPS (25 ng/kg/day) (n=15). Data are presented as mean ± SEM.

p-value: 0,08 t test

(E) Cumulative percentage of female rats reaching vaginal opening in relation to age in females exposed to corn oil (control) (n= 12) or BPS (25 ng/kg/day) (n=15) during gestation and lactation .

p-value 0,17 Cox regression

(F) Percent of female rats presenting regular cycles during a period of 3 weeks in females exposed to corn oil (control) (n= 6) or BPS (25 ng/kg/day) (n=8) during gestation and lactation

Effects of developmental exposure to environmentally relevant dose of BPS on placental transcriptome

In order to identify BPA and/or BPS transcriptional targets which could mediate their effects on pregnancy and fetal outcomes, RNA was extracted from placenta exposed to corn oil or BPA or BPS (25 ng/kg/day or 4 µg/kg/day) collected on GD18 and analyzed using RNA sequencing.

A first exploratory Principal Component Analysis (PCA) of RNA sequencing data showed weak segregation based on gene-level expression between placentas exposed to corn oil, BPS or BPA (Fig. 4A) with a variance of 29% for the first component and 14% for the second component. Based on a log fold change threshold $> +/- 0.5$ and an *adjusted p value* < 0.05 , exposure to BPS 25ng significantly affected the placental expression of a limited number of genes (Fig. 4B). Three of the 4 genes that were significantly down-regulated after exposure to BPS 25 ng are known to play a role in implantation and early placentation (*Wnt7b*, *AABR07002659.1* and *Fut2*) (Fig. 4C). Exposure to the higher dose of BPS (4 µg/kg/day) or to BPA (25 ng/kg/day or 4 µg/kg/day) affected a limited number of placental genes (Fig.4B). Among them, several genes were involved in transcription regulation (*Sap30l*, *Rmnd5b*, *Zmiz2*) (Fig. 4C).

A closer investigation shows that very few placental genes are commonly affected by both doses of BPA and BPS. There was no gene commonly affected by the same low dose of BPA and BPS (Fig. 4B). Exposure to the higher dose of BPA and BPS (4 µg/kg/day) affected the expression of only 2 genes in common (*LOC 103689945* and *Fut2*) (Fig. 4C), suggesting different transcriptional alterations caused by BPA and BPS in the placenta.

Because exposure to BPS 25 impaired pregnancy success and led to prenatal and postnatal growth restriction in female offspring, we performed a functional enrichment analysis of differentially affected genes after exposure to this very low dose of BPS based on a less restrictive *p value* < 0.05 . This analysis revealed

enrichment of GO terms related to fetal development (*hindlimb morphogenesis, forelimb morphogenesis, myoblast differentiation, skeletal system morphogenesis, mammary gland development, heart morphogenesis, cartilage development, palate development, lung development*) (Fig. S2). Among the enriched GO terms, 11 were involved in placental-brain axis (*cell proliferation in forebrain, regulation of axonogenesis, dendritic spine development, neuron cellular homeostasis, neurotransmitter secretion, adult walking behavior, learning, regulation of synaptic vesicles exocytosis, positive regulation of neuronal apoptotic process, cerebral cortex development, neuron apoptotic process*) (Fig. S2). Genes involved in placenta development, fertilization and female pregnancy were also found to be enriched (Fig. S2).

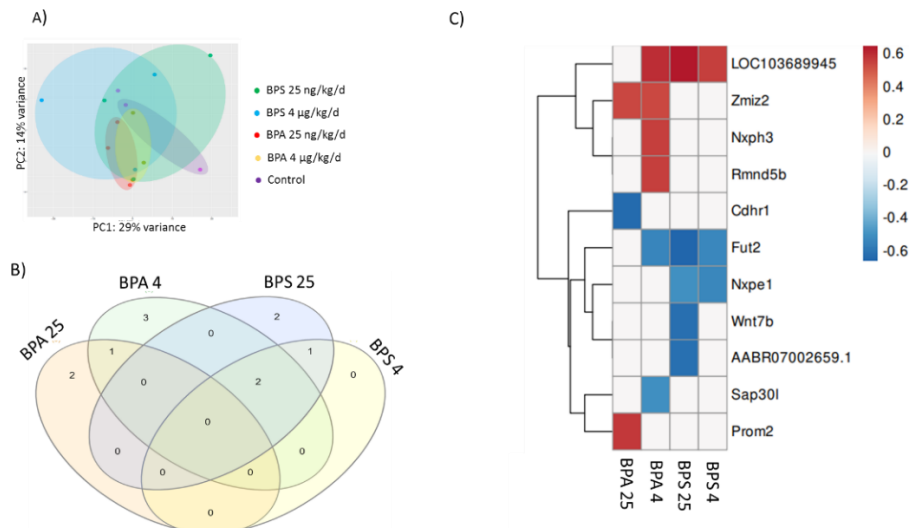


Figure 4. Placental transcriptome modifications following developmental exposure to BPA and BPS.

(A) Principal activity component (PCA) plot showing the dispersion of the transcriptome of placentas on GD18 after perinatal exposure to corn oil (control); BPS 25 ng/kg/day; BPS 4 µg/kg/day ; BPA 25 ng/kg/day or BPA 4 µg/kg/day (n=3/group). Each dot represents one individual sample.

(B) Venn diagrams representing the number of differentially expressed transcripts based on an *adjusted p-value* < 0.05 for 2 doses of BPA (25 ng/kg/day or 4 µg/kg/day) or BPS (25 ng/kg/day or 4 µg/kg/day) compared to controls (n=3/group). *BPA25*: BPA 25ng/kg/d, *BPA4*: BPA 4µg/kg/d, *BPS 25*: BPS 25 ng/kg/d, *BPS4*: BPS 4 µg/kg/d.

(C) Heatmap representing the Log2 fold change of the most affected up- or down-regulated genes in the placenta. Red or blue colors indicate a significant change in expression (*adjusted p-value* < 0.05). Grey indicates non-significant changes.

Developmental exposure to environmentally relevant dose of BPS affects placental expression of Steroid Receptor Coactivator 2 (SRC2)

Because BPA and BPS interact with estrogen receptors and affects their expression (Hewitt and Korach 2011; Kuiper et al. 1998), we assessed estrogen receptors (ERs) and steroid receptor coactivators (SRCs) mRNA expression in the placenta. Neither BPA nor BPS affected *Esr1* mRNA expression in the placenta (Fig. 5A). We did not detect *Esr2* mRNA in female rat placenta at this gestational age, suggesting a very weak expression of this receptor as reported by other authors (Al-Bader 2006). *Src1* mRNA expression was not affected by BPA or BPS exposure (Fig. 5B). *Src2* mRNA expression was very significantly decreased by both doses of BPA or BPS (Fig. 5C) while *Src3* mRNA expression was significantly higher after exposure to BPS 25ng (Fig. 5D).

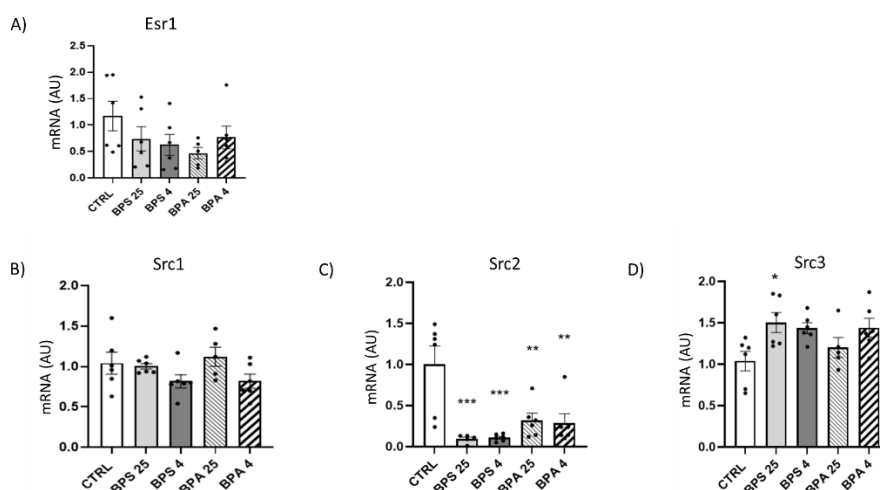


Figure 5: Female placental mRNA expression of estrogen receptors (ERs) and steroid receptor coactivators (SRCs) following developmental exposure to BPA and BPS

mRNA expression of Estrogen receptor 1 (*Esr1*) (A), Steroid receptor coactivator 1 (*Src1*) (B), Steroid receptor coactivator 2 (*Src2*) (C) and Steroid receptor coactivator 3 (*Src3*) (D) in female placenta exposed to corn oil (control); BPS 25 ng/kg/day; BPS 4 µg/kg/day; BPA 25 ng/kg/day and BPA 4 µg/kg/day as determined by real time PCR (n=6/group). Samples originates from six different litters per group. RNA expression data were normalized by dividing each individual value by the control group average value.

Developmental exposure to environmentally relevant dose of BPS affects SRC2 methylation and the transcriptional activity of enzymes regulating DNA methylation

In order to determine if changes of placental *SRC2* mRNA expression could be related to DNA methylation modifications, we studied the DNA methylation pattern of the *SRC2* CpG islands in female placenta exposed to BPA and BPS using bisulfite sequencing. The percentage of methylation was significantly lower at 6 out of 24 CpG sites of the *SRC2* promoter after exposure to BPS 25 ng compared to controls but was not significantly affected by the higher dose of BPS (Fig. 6). BPA 4 µg significantly decreased the percentage of methylation at 1 CpG site of the *SRC2* CpG islands (Fig. 6).

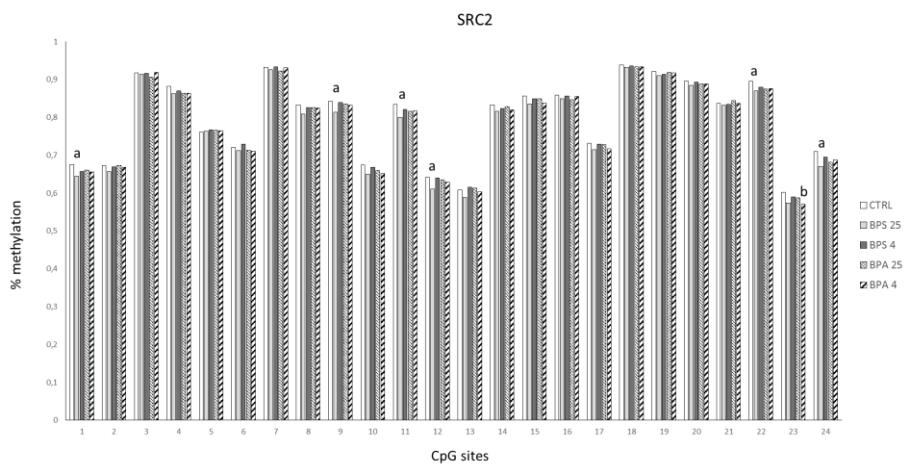


Figure 6: DNA methylation of SRC2 promoter in female placenta following developmental exposure to BPA and BPS

DNA Methylation at 24 CpG sites of SRC2 promoter in female placenta exposed to BPS 25 ng/kg/d, BPS 4 µg/kg/day, BPA 25 ng/kg/day and BPA 4 µg/kg/day as determined by bisulfite sequencing n: 6 replicates tested per group

a: *p*-value < 0,05 CTRL vs BPS 25; b: *p*-value < 0,05 CTRL vs BPA 4

In order to approach potential mechanisms involved in the effect of BSP exposure on SRC2 DNA methylation, we studied the placental mRNA expression of enzymes involved in regulation of DNA methylation.

Exposure to both doses of BPS and the highest dose of BPA significantly down regulated *Tet2* mRNA expression in the placenta (Fig. 7). Neither BPA nor BPS affected *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* or *Tet1* expression (Fig. 7).

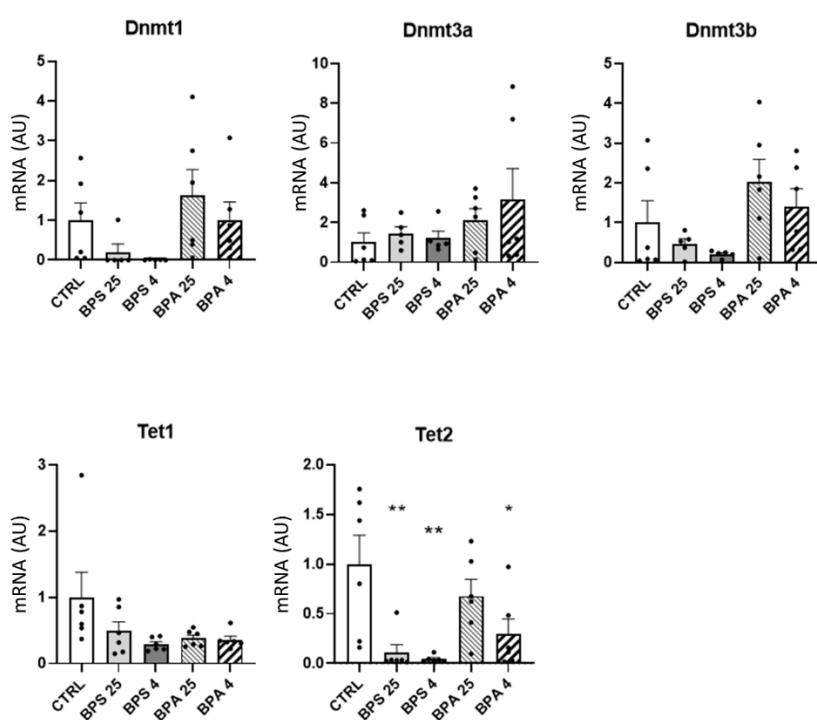


Figure 7: mRNA expression of enzymes regulating DNA methylation in female placenta following developmental exposure to BPA and BPS.

Expression of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1* and *Tet2* mRNA in female placenta exposed to corn oil, BPA 25 ng/kg/d, BPA 4 µg/kg/day, BPS 25 ng/kg/day and BPS 4 µg/kg/day as determined by QPCR (n=6/group). Samples originates from six different litters per group. RNA expression data were normalized by dividing each individual value by the control group average value.

* p-value < 0,05 ** p-value < 0,01

Dnmt1 DNA methyltransferase 1 *Dnmt3a* DNA methyltransferase 3a *Dnmt3b* DNA methyltransferase 3b

Tet 1 ten-eleven-translocation 1 *Tet 2* ten-eleven-translocation 2

Discussion

Numerous studies have raised concerns regarding the adverse health effects of developmental exposure to BPA (Golub et al. 2010; Rochester 2013). Therefore, regulations regarding BPA in consumer products have been tightened in order to limit prenatal and early postnatal exposure. Such regulation led the industry to develop BPA substitutes such as Bisphenol S (BPS; 4, 4'-sulfonyldiphenol). However, despite its chemical similarities with BPA, data evaluating BPS effects *in vivo* is still scarce.

In the present study, we provide evidence that prenatal exposure to environmentally relevant doses of BPS impairs mating success rate and fetal/postnatal female growth in rats. Such impairment was not observed after exposure to the same dose of BPA, indicating differential effects and mechanisms of action. This decrease in mating success rate and fetal growth might be associated with alterations of placental function as indicated by limited but significant changes in the transcription and DNA methylation pattern of specific placental genes involved in placentation.

To our knowledge, very few studies have investigated the effects of early exposure to BPS on pregnancy outcomes and fetal development. Our results indicate that exposure to a very low dose of BPS before mating and throughout gestation affects pregnancy success rate. Previous studies have shown that a later exposure (from GD6 to the end of gestation) to 1 or 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPS did not affect the number of abortions or stillborn pups (Kaimal et al. 2021) in rats which, taken together with our data, suggests that early implantation could be sensitive to low doses of BPS. Exposure to higher doses (200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) before mating and during gestation did not impair pregnancy success (Mao et al. 2020).

Implantation is a crucial step in the establishment of a successful pregnancy and is regulated by key factors such as nitric oxide, cytokines, prostaglandins but also

sex steroids (Wang and Dey 2006). In parallel to the lower mating success caused by exposure to BPS 25 ng, RNA sequencing analysis highlighted the decrease in expression of genes involved in embryo implantation and placenta development. *Fut2*, which is known to be regulated by estradiol (Domino and Hurd 2004) is involved in the synthesis of embryoadhesive fucosylated glycoconjugates, contributing to blastocyst attachment to the uterine wall (Domino et al. 2001). *AABR07002659.1*, also known as *pregnancy-specific glycoprotein 22-like*, encodes a protein belonging to the pregnancy-specific glycoprotein family, supports vascular adaptations and angiogenesis involved in successful implantation and placental development (Blois et al. 2012). *Wnt7b* expression is significantly decreased after exposure to BPS 25 ng. *Wnt7b* belongs to the family of secreted wingless ligands. In mice, homozygous *Wnt7b* mutation leads to death at mid gestation as a result of placental abnormalities (Parr et al. 2001) demonstrating the crucial role of the *Wnt* signaling pathway in early placental development in mammals (Knöfler et al. 2019; Zhu et al. 2017). Previous studies have already shown that *Wnt* signaling pathway appears to be a target of BPA and BPS exposure (Mao et al. 2020; Tait et al. 2015; Ye et al. 2019). In our study, *Wnt 7b* expression was decreased in placentas exposed to the low dose of BPS but not in placentas exposed to the higher dose of BPS or both doses of BPA, illustrating the potential role of *Wnt 7b* in mediating BPS 25 effects on pregnancy success rate. Additionally, GO analysis highlighted the impact of BPS on the placenta-brain-axis. This is consistent with previous study showing that exposure to BPA and BPS affects this axis through modification of serotonin concentration in the placenta (Mao et al. 2020).

Our study showed that exposure to environmentally relevant doses of BPA and BPS significantly decreased placental expression of *SRC2*, also known as *NCOA2*. *SRC2* belongs to the steroid receptor coactivator (SRC) family, and is a key mediator of placental and endometrial response to estrogens and progesterone (Dasgupta et al. 2014). It plays a key role in preparing the endometrium for implantation

(Kommagani et al. 2013) as illustrated by the implantation failure and partial loss of decidualization caused by uterine ablation of *SRC2* (Jeong et al. 2007; Mukherjee et al. 2006a, 2006b). *SRC2* mediates the effects of progesterone on genes coding for developmentally important signaling molecule such as Wnt signaling pathway (Jeong et al. 2007). *Wnt7b* expression was decreased by the lower dose of BPS in our study but was not identified as a progesterone target modulated by *SRC2* in the placenta (Jeong et al. 2007). *SRC2* mRNA and protein expression in the testis and the mammary gland is sensitive to developmental exposure to BPA (Betancourt et al. 2010; Salian-Mehta et al. 2014). However, no study had reported an effect of developmental exposure to BPS on *SRC2* expression so far. Our model suggests that decreased expression of *SRC2* could participate to the poor mating success rate caused by BPS through alterations of progesterone-dependent endometrial decidualization (Mukherjee et al. 2006; Kommagani et al. 2013). However, decreased placental expression of *SRC2* was observed after exposure to all doses of BPS and BPA despite different phenotypical consequences. This suggests that *SRC2* dysregulation is very sensitive to endocrine disruption but is not sufficient to explain placental endocrine disruption. Even though the role of SRCs in placental functions is not fully understood, changes in SRC expression in the placenta of preeclampsia like-rat suggest that they might be good candidate biomarkers for environmental cues (Jeong et al. 2020).

In our model, the transcriptional down-regulation of *SRC2* expression was associated with epigenetic modifications of its promoter. Those epigenetic modifications were mainly present in placentas exposed to the lower dose of BPS. Those results indicate that placental DNA methylation of *SRC2* is more sensitive to low doses of BPS. These findings are consistent with a previous study showing hepatic DNA methylation changes after developmental exposure to BPS 1.5 µg/kg/day (Brulport et al. 2020). The decreased methylation of *SRC2* promoter after exposure to BPS 25 ng was associated with a decreased expression of *SRC2* mRNA

in the placenta suggesting potential other epigenetic mechanisms to explain the decrease in *SRC2* expression (Miller and Grant 2013).

Exposure to BPA and BPS decreased placental mRNA expression of *Tet2*, an enzyme involved in DNA demethylation. These results are consistent with the decreased in *Tet2* expression documented in the brain of adult mice after *in utero* exposure to BPA (Malloy et al. 2019). Decreased expression of *Tet2* is known to be associated with poor placental development (Li et al. 2018). Our results suggest that developmental exposure to BPA and BPS could impact the finely tuned placental methylome, through dysregulation of *Tet2* expression. Our study suggests that developmental exposure to BPS 25 ng may mediate its placental effects by interfering with epigenetic mechanisms that remain to be specifically identified.

Transcriptome analysis of the placenta offers a tool to investigate placental dysfunction and provide biomarkers in various pathologies (Cox et al. 2015). Several studies have shown that the placental transcriptome can be affected by exposure to BPA (Imanishi et al. 2003; Kang et al. 2011; Lee et al. 2016; Mao et al. 2020; Susiarjo et al. 2013; Tait et al. 2015; Tan et al. 2013; Ye et al. 2019). Prenatal exposure (starting 2 weeks before mating) to high doses of BPA (10 mg/kg/day or 10 µg/kg/day) significantly disrupts the expression of imprinted genes and reduced global methylation levels in the mouse placenta (Susiarjo et al. 2013). Conversely, only mild perturbation of expression of imprinted genes have been reported when exposure to BPA (200 mg/kg/day) occurs later during pregnancy (Kang et al. 2011), highlighting that exposure before early placental and fetal development is crucial when investigating placental transcriptome and epigenome. Very few data are available regarding the effects of BPS exposure on placental transcriptome and epigenome. Exposure to BPS interferes with the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway in human placental cytotrophoblast cells and extravillous trophoblasts through EGFR antagonism (Ticiani et al. 2022). EGFR signaling plays a crucial role in placental development and survival (Dackor et al. 2007; Filla and Kaul

1997). Gestational exposure to BPS has also been reported to reduce expression of specific genes involved in trophoblast cell fusion (*JSRV* and *HYAL2*) in the sheep placenta (Gingrich et al. 2018). In mice, Rosenfeld et al have shown that prenatal exposure to BPS and BPA 200 µg/kg/day from two weeks before gestation until ED12.5 similarly affected the placental expression of 13 genes (Mao et al. 2020). Those genes were different from those we have identified, highlighting the different mechanisms by which BPA and BPS exposure can affect placental function depending on doses and animal model. Similarly to this study, we have identified a relatively low number of placental genes significantly affected by BPA and BPS exposure. However, those genes play a crucial role in placentation and could explain the decrease in pregnancy success and fetal growth. We performed RNA seq analysis on whole placentas which contain several cell types. Further investigation should focus on characterizing EDCs effects on individual placental cell populations.

Our results show that average fetal male and female weight was significantly decreased by developmental exposure to the lower dose of BPS or BPA (25 ng/kg/day). To our knowledge, our study is the first to identify an association between prenatal exposure to BPS and reduced female weight at birth and during adulthood. This result differs from previous works showing no effect of developmental exposure to BPS on average fetal weight at birth (Catanese and Vandenberg 2017; Kaimal et al. 2021). In our model, exposure to BPS started one week before gestation while other studies started exposure later during gestation (GD6 or GD9). This suggests that BPS exposure could impact fetal growth trajectory when it occurs at very early stage of embryonic development. Other studies used higher dosing (1 or 5 µg/kg/day; 200 µg/kg/day) which suggests more detrimental effects with very low and environmentally relevant doses of BPS. Lastly, although very few studies have taken sex difference into account (Imanishi et al. 2003), we analyzed male and female placentas and pups separately because sex influences

the placental response to environmental chemicals (Rosenfeld 2015). Based on our results, it seems that exposure to BPS leads to sex specific effects on growth trajectory. This response can become apparent later in life as suggested by the different growth trajectory of female and male offspring perinatally exposed to BPS.

In human, conflicting data exist regarding the potential adverse effects of BPA exposure on fetal growth outcomes. Some authors reported an association between high maternal BPA urinary concentrations (evaluated on 3 samples) and low birth weight (Snijder et al. 2013), which may differ with sex : Veiga-Lopez *et al* reported higher risk of low birthweight in newborn girls (Veiga-Lopez et al. 2015) while Chou *et al* reported higher risk of low birthweight in newborn boys with higher exposure to BPA (Chou et al. 2011) . In contrast, other findings did not support any association between BPA exposure and fetal growth (Casas et al. 2016; Smarr et al. 2015). A recent study showed an association between preconceptional maternal BPA levels and birth weight, suggesting a very early reprogramming of fetal growth trajectory (Mustieles et al. 2018). Few studies have been published and lead to various results regarding BPS impact on fetal growth in humans. Goodrich *et al* (2019) reported an increased risk of low birth weight in newborn prenatally exposed to higher levels of BPS (Goodrich et al. 2019) while Wan *et al* did not report any effect of BPS on birth weight (Wan et al. 2018).

In conclusion, the present study showed that developmental exposure to a very low dose of BPS impairs mating success rate and fetal growth and decreases the placental expression of key genes involved in embryo implantation and placental development. Our data illustrates the impact of an early environmental insult on the fetoplacental unit and indicates that transcriptional and epigenetic changes may be one of the mechanism involved in early programming of health, along the concept of developmental origin of health and disease. This study reinforces the

risk generated by replacement products such as BPS with effects and mechanisms of action potentially different from BPA.

Bibliography

- Balico A, Bidondo ML, Fillol C, Gane J, Oleko A, Saoudi A et al. 2019. Imprégnation de la population française par les bisphénols A, S et F. Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016. Santé publique France.
- Betancourt A, Eltoum I, Desmond R, Russo J, and Lamartiniere C. 2010. In Utero Exposure to Bisphenol A Shifts the Window of Susceptibility for Mammary Carcinogenesis in the Rat. *Environmental Health Perspectives* 118 (11): 1614-19. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002148>
- Blois S, Tirado-González I, Wu J, Barrientos G, Johnson B, Warren J et al. 2012. Early Expression of Pregnancy-Specific Glycoprotein 22 (PSG22) by Trophoblast Cells Modulates Angiogenesis in Mice. *Biology of Reproduction* 86 (6): 191. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.098251>.
- Bromer J, Zhou Y, Taylor M, Doherty L, and Taylor H. 2010. Bisphenol-A Exposure in Utero Leads to Epigenetic Alterations in the Developmental Programming of Uterine Estrogen Response. *FASEB Journal* : 24 (7): 2273-80. <https://doi.org/10.1096/fj.09-140533>.
- Brulport A, Vaiman D, Chagnon MC, and Le Corre L. 2020. Obesogen Effect of Bisphenol S Alters MRNA Expression and DNA Methylation Profiling in Male Mouse Liver. *Chemosphere* 241: 125092. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125092>.
- Calafat A, Kuklenyik Z, Reidy J, Caudill S, Ekong J and Needham L. 2005. Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population. *Environmental Health Perspectives* 113 (4): 391-95. <https://doi.org/10.1289/ehp.7534>.
- Calafat A, Ye X, Wong LY, Reidy JA, and Needham L. 2008. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-Tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives* 116 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>.
- Casas M, Valvi D, Ballesteros G, Gascon M, Fernández M, García-Esteban R, et al. 2016. Exposure to Bisphenol A and Phthalates during Pregnancy and Ultrasound Measures of Fetal Growth in the INMA-Sabadell Cohort. *Environmental Health Perspectives* 124 (4): 521-28. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409190>.
- Catanese M, and Vandenberg L. 2017. Bisphenol S (BPS) Alters Maternal Behavior and Brain in Mice Exposed During Pregnancy/Lactation and Their Daughters. *Endocrinology* 158 (3): 516-30. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1723>.
- Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, and Margaret Widelka. 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environmental Science & Technology* 50 (11): 5438-53. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>.
- Chou WC, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, and Chuang CY. 2011. Biomonitoring of Bisphenol A Concentrations in Maternal and Umbilical Cord Blood in Regard to Birth Outcomes and Adipokine Expression: A Birth Cohort Study in Taiwan. *Environmental Health*: 10 : 94. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-94>.
- Covaci A, Den Hond H, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H et al. 2015. Urinary BPA Measurements in Children and Mothers from Six European Member States: Overall

- Results and Determinants of Exposure. *Environmental Research* 141: 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.008>.
- Cox B, Leavey K, Nosi U, Wong F and Kingdom J. 2015. Placental Transcriptome in Development and Pathology: Expression, Function, and Methods of Analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213 (4 Suppl): S138-151. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.046>.
- Dackor J, Strunk K, Wehmeyer M and Threadgill D. 2007. Altered Trophoblast Proliferation Is Insufficient to Account for Placental Dysfunction in Egfr Null Embryos. *Placenta* 28 (11-12): 1211-18. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.07.005>.
- Dasgupta S, Lonard D and O'Malley B. 2014. Nuclear Receptor Coactivators: Master Regulators of Human Health and Disease. *Annual Review of Medicine* 65: 279-92. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051812-145316>.
- Domino S, Zhang L, Gillespie P, Saunders T and Lowe J. 2001. Deficiency of Reproductive Tract Alpha(1,2) Fucosylated Glycans and Normal Fertility in Mice with Targeted Deletions of the FUT1 or FUT2 Alpha(1,2) Fucosyltransferase Locus. *Molecular and Cellular Biology* 21 (24): 8336-45. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8336-8345.2001>.
- Domino S and Hurd E. 2004. LacZ Expression in Fut2-LacZ Reporter Mice Reveals Estrogen-Regulated Endocervical Glandular Expression during Estrous Cycle, Hormone Replacement, and Pregnancy. *Glycobiology* 14 (2): 169-75. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh019>.
- Edlow A, Chen M, Smith N, Lu C and McElrath T. 2012. Fetal Bisphenol A Exposure: Concentration of Conjugated and Unconjugated Bisphenol A in Amniotic Fluid in the Second and Third Trimesters. *Reproductive Toxicology* 34 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.03.009>.
- Engel S, Levy B, Liu Z, Kaplan D and Wolff M. 2006. Xenobiotic Phenols in Early Pregnancy Amniotic Fluid. *Reproductive Toxicology* 21 (1): 110-12. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.07.007>.
- Escriva L, Hanberg A, Zilliacus J, Beronius A. 2019. Assessment of the endocrine disrupting properties of Bisphenol AF according to the EU criteria and ECHA/EFSA guidance. *EFSA Journal* 2019;17(S2):e170914, 10 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.e170914>
- Filla M, and Kaul K. 1997. Relative Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Placental Cytotrophoblasts and Choriocarcinoma Cell Lines. *Placenta* 18 (1): 17-27. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(97\)90067-9](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(97)90067-9).
- Franssen D, Ioannou Y, Alvarez-real A, Gerard A, Mueller J, Heger S et al. 2014. Pubertal Timing after Neonatal Diethylstilbestrol Exposure in Female Rats: Neuroendocrine vs Peripheral Effects and Additive Role of Prenatal Food Restriction. *Reproductive Toxicology* 44 : 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.10.006>.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P et al. 2012. A Review of Dietary and Non-Dietary Exposure to Bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*: 50 (10): 3725-40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>.
- Gingrich J, Pu Y, Roberts J, Karthikraj R, Kannan K, Ehrhardt R et al. 2018. Gestational Bisphenol S Impairs Placental Endocrine Function and the Fusogenic Trophoblast Signaling Pathway. *Archives of Toxicology* 92 (5): 1861-76. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2191-2>.

- Gingrich J, Ticiani E and Veiga-Lopez A. 2020. Placenta Disrupted: Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 31 (7): 508-24. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.03.003>.
- Goldman J, Murr A and Cooper R. 2007. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 80 (2): 84-97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>.
- Golub M, Wu K, Kaufman F, Li L-H, Moran-Messen F, Zeise L et al. 2010. Bisphenol A: Developmental Toxicity from Early Prenatal Exposure. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 89 (6): 441-66. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20275>.
- Goodrich J, Ingle M, Domino S, Treadwell M, Dolinoy DC, Burant C et al. 2019. First Trimester Maternal Exposures to Endocrine Disrupting Chemicals and Metals and Fetal Size in the Michigan Mother-Infant Pairs Study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 10 (4): 447-58. <https://doi.org/10.1017/S204017441800106X>.
- Hewitt S and Korach K. 2011. Estrogenic Activity of Bisphenol A and 2,2-Bis (p-Hydroxyphenyl)-1,1,1-Trichloroethane (HPTE) Demonstrated in Mouse Uterine Gene Profiles. *Environmental Health Perspectives* 119 (1): 63-70. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002347>.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y and Taketani Y. 2002. Determination of Bisphenol A Concentrations in Human Biological Fluids Reveals Significant Early Prenatal Exposure. *Human Reproduction* 17 (11): 2839-41. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2839>.
- Imanishi S, Manabe N, Nishizawa H, Morita M, Sugimoto M, Iwahori M et al. 2003. Effects of Oral Exposure of Bisphenol A on mRNA Expression of Nuclear Receptors in Murine Placentae Assessed by DNA Microarray. *The Journal of Reproduction and Development* 49 (4): 329-36. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.329>.
- Jeong JW, Lee K, Han SJ, Aronow B, Lydon J, O'Malley B et al. 2007. The P160 Steroid Receptor Coactivator 2, SRC-2, Regulates Murine Endometrial Function and Regulates Progesterone-Independent and -Dependent Gene Expression. *Endocrinology* 148 (9): 4238-50. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0122>.
- Jeong JS, Lee DH, Lee JE, An SM, Yi PY, Lee GS et al. 2020. The Expression and Contribution of SRCs with Preeclampsia Placenta. *Reproductive Sciences* 27 (7): 1513-21. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00142-5>.
- Kaimal A, Al Mansi M, Bou Dagher J, Pope C, Varghese M, Rudi T et al. 2021. Prenatal Exposure to Bisphenols Affects Pregnancy Outcomes and Offspring Development in Rats. *Chemosphere* 276: 130118. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130118>.
- Kang E-R, Iqbal Q, Tran D, Rivas G, Singh P, Pfeifer G et al. 2011. Effects of Endocrine Disruptors on Imprinted Gene Expression in the Mouse Embryo. *Epigenetics* 6 (7): 937-50. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16067>.
- Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage T and James J. 2019. Human Placenta and Trophoblast Development: Key Molecular Mechanisms and Model Systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 76 (18): 3479-96. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>.
- Kolatorova L, Vitku J, Hampel R, Adamcova K, Skodova T, Simkova M et al. 2018. Exposure to Bisphenols and Parabens during Pregnancy and Relations to Steroid Changes. *Environmental Research* 163: 115-22. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.031>.

- Kommagani R, Szwarc M, Kovanci E, Gibbons W, Putluri N, Maity S et al. 2013. Acceleration of the Glycolytic Flux by Steroid Receptor Coactivator-2 Is Essential for Endometrial Decidualization. *PLoS Genetics* 9 (10): e1003900. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003900>.
- Kuiper G, Lemmen J, Carlsson B, Corton J, Safe S, van der Saag P, et al. 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta. *Endocrinology* 139 (10): 4252-63. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>.
- Kundakovic M, Gudsruk K, Franks B, Madrid J, Miller R, Perera F et al. 2013. Sex-Specific Epigenetic Disruption and Behavioral Changes Following Low-Dose in Utero Bisphenol A Exposure. *Proc Nat Acad Sci USA* 110 (24): 9956-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214056110>.
- Lee JH, Ahn C, Kang HY, Hong EJ, Hyun SH, Choi KV and Jeung EB. 2016. Effects of Octylphenol and Bisphenol A on the Metal Cation Transporter Channels of Mouse Placentas. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (10): 965. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100965>.
- Li A, Zhuang T, Shi W, Liang Y, Liao C, Song M et al. 2020. Serum Concentration of Bisphenol Analogues in Pregnant Women in China. *The Science of the Total Environment* 707 : 136100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136100>.
- Li Q, Davila J, Kannan A, Flaws J, Bagchi M and Bagchi I. 2016. Chronic Exposure to Bisphenol A Affects Uterine Function During Early Pregnancy in Mice. *Endocrinology* 157 (5): 1764-74. <https://doi.org/10.1210/en.2015-2031>.
- Li X, Wu C, Shen Y, Wang K, Tang L, Zhou M et al. 2018. Ten-Eleven Translocation 2 Demethylates the MMP9 Promoter, and Its down-Regulation in Preeclampsia Impairs Trophoblast Migration and Invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 293 (26): 10059-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001265>.
- Liao C, Liu F, Guo Y, Moon HB, Nakata H, Wu Q, et al. 2012. Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environmental Science & Technology* 46 (16): 9138-45. <https://doi.org/10.1021/es302004w>.
- Maie D. 2006. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Rat Placenta: Detection by RT-PCR, Real Time PCR and Western Blotting. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4 : 13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-13>.
- Malloy M, Kochmanski J, Jones T, Colacino J, Goodrich J, Dolinoy D, et al. 2019. Perinatal Bisphenol A Exposure and Reprogramming of Imprinted Gene Expression in the Adult Mouse Brain. *Frontiers in Genetics* 10: 951. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00951>.
- Mao J, Jain A, Denslow N, Nouri MZ, Chen S, Wang T et al. 2020. Bisphenol A and Bisphenol S Disruptions of the Mouse Placenta and Potential Effects on the Placenta-Brain Axis. *Proc Nat Acad Sci USA* 117 (9): 4642-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.
- Meng Z, Wang D, Liu W, Li R, Yan S, Jia M et al. 2019. Perinatal Exposure to Bisphenol S (BPS) Promotes Obesity Development by Interfering with Lipid and Glucose Metabolism in Male Mouse Offspring. *Environmental Research* 173: 189-98. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.038>.
- Meng Z, Wang D, Yan S, Li R, Yan J, Teng M et al. 2018. Effects of Perinatal Exposure to BPA and Its Alternatives (BPS, BPF and BPAF) on Hepatic Lipid and Glucose Homeostasis in Female Mice Adolescent Offspring. *Chemosphere* 212: 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.076>.

- Miller J and Grant P. 2013. The Role of DNA Methylation and Histone Modifications in Transcriptional Regulation in Humans. *Sub-Cellular Biochemistry* 61: 289-317. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_13.
- Mukherjee A, Amato P, Allred D, Fernandez-Valdivia R, Nguyen J, O'Malley B et al. 2006a. Steroid Receptor Coactivator 2 Is Essential for Progesterone-Dependent Uterine Function and Mammary Morphogenesis: Insights from the Mouse--Implications for the Human. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102 (1-5): 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.007>.
- Mukherjee A, Soyak S, Fernandez-Valdivia R, Gehin M, Chambon P, Demayo F et al. 2006b. Steroid Receptor Coactivator 2 Is Critical for Progesterone-Dependent Uterine Function and Mammary Morphogenesis in the Mouse. *Molecular and Cellular Biology* 26 (17): 6571-83. <https://doi.org/10.1128/MCB.00654-06>.
- Mustieles V, Williams P, Fernandez M, Mínguez-Alarcón L, Ford J, Calafat A et al. 2018. Maternal and Paternal Preconception Exposure to Bisphenols and Size at Birth. *Human Reproduction* 33 (8): 1528-37. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey234>.
- Pan X, Wang X, Sun Y, Dou Z and Li Z. 2015. Inhibitory effects of preimplantation exposure to bisphenol-A on blastocyst development and implantation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (6): 8720-29.
- Parr B, Cornish V, Cybulsky M and McMahon A. 2001. Wnt7b Regulates Placental Development in Mice. *Developmental Biology* 237 (2): 324-32. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0373>.
- Pfaffl MW. 2001. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pivonello C, Muscogiuri G, Nardone A, Garifalos F, Provisiero D, Verde N et al. 2020. Bisphenol A: An Emerging Threat to Female Fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 18 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0558-8>.
- Rochester JR. 2013. Bisphenol A and Human Health: A Review of the Literature. *Reproductive Toxicology* 42: 132-55. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>.
- Rosenfeld CS 2015. Sex-Specific Placental Responses in Fetal Development. *Endocrinology* 156 (10): 3422-34. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1227>.
- Salian-Mehta S, Doshi T and Vanage T. 2014. Exposure of Neonatal Rats to the Endocrine Disrupter Bisphenol A Affects Ontogenic Expression Pattern of Testicular Steroid Receptors and Their Coregulators. *Journal of Applied Toxicology*: 34 (3): 307-18. <https://doi.org/10.1002/jat.2882>.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness C, Paul M and Chahoud I. 2002. Parent Bisphenol A Accumulation in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environmental Health Perspectives* 110 (11): A703-707. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241091>.
- Smarr M, Grantz K, Sundaram R, Maisog J, Kannan K and, et Buck Louis G. 2015. Parental Urinary Biomarkers of Preconception Exposure to Bisphenol A and Phthalates in Relation to Birth Outcomes. *Environmental Health* : 14 : 73. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0060-5>.
- Snijder C, Heederik D, Pierik F, Hofman A, Jaddoe V, Koch HM et al. 2013. Fetal Growth and Prenatal Exposure to Bisphenol A: The Generation R Study. *Environmental Health Perspectives* 121 (3): 393-98. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205296>.

- Strakovsky R and Schantz L. 2018. Impacts of Bisphenol A (BPA) and Phthalate Exposures on Epigenetic Outcomes in the Human Placenta. *Environmental Epigenetics* 4 (3): dvy022. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy022>.
- Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C and Bartolomei M. 2013. Bisphenol a Exposure Disrupts Genomic Imprinting in the Mouse. *PLoS Genetics* 9 (4): e1003401. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003401>.
- Tait S, Tassinari R, Maranghi F and Mantovani A. 2015. Bisphenol A Affects Placental Layers Morphology and Angiogenesis during Early Pregnancy Phase in Mice. *Journal of Applied Toxicology*: 35 (11): 1278-91. <https://doi.org/10.1002/jat.3176>.
- Tan W, Huang H, Wang Y, Wong TY, Wang C, and Leung L. 2013. Bisphenol A Differentially Activates Protein Kinase C Isoforms in Murine Placental Tissue. *Toxicology and Applied Pharmacology* 269 (2): 163-68. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.03.016>.
- Taniguchi K, Kawai T and Hata K. 2018. Placental Development and Nutritional Environment. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1012: 63-73. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5526-3_7.
- Tian FY, Everson T, Lester B, Punshon T, Jackson B, Hao K et al. 2020. Selenium-Associated DNA Methylation Modifications in Placenta and Neurobehavioral Development of Newborns: An Epigenome-Wide Study of Two U.S. Birth Cohorts. *Environment International* 137: 105508. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105508>.
- Ticiani E, Pu Y, Gingrich J and Veiga-Lopez A. 2022. Bisphenol S Impairs Invasion and Proliferation of Extravillous Trophoblasts Cells by Interfering with Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (2): 671. <https://doi.org/10.3390/ijms23020671>.
- Toro C, Wright H, Aylwin C, Ojeda S and Lomniczi A. 2018. Trithorax Dependent Changes in Chromatin Landscape at Enhancer and Promoter Regions Drive Female Puberty. *Nature Communications* 9 (1): 57. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02512-1>.
- Vandenberg L, Chahoud I, Heindel J, Padmanabhan V, Paumgartten F and Schoenfelder G. 2010. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 118 (8): 1055-70. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>.
- Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, Ye W, Domino S and Padmanabhan V. 2015. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (11): E1394-1403. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1724>.
- Vrooman L, Xin F and Bartolomei M. 2016. Morphologic and Molecular Changes in the Placenta: What We Can Learn from Environmental Exposures. *Fertility and Sterility* 106 (4): 930-40. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.016>.
- Wan Y, Huo W, Xu S, Zheng T, Zhang B, Li Y, Zhou A, et al. 2018. Relationship between Maternal Exposure to Bisphenol S and Pregnancy Duration. *Environmental Pollution* 238 : 717-24. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.057>.
- Wang H and Dey S. 2006. Roadmap to Embryo Implantation: Clues from Mouse Models. *Nature Reviews. Genetics* 7 (3): 185-99. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>.
- WHO/UNEP. 2013. *WHO | Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, and G. Van Der Kraakeds. World Health Organization.

- Wu LH, Zhang XM, Wang F, Gao CJ, Chen D, Palumbo J et al. 2018. Occurrence of Bisphenol S in the Environment and Implications for Human Exposure: A Short Review. *The Science of the Total Environment* 615 : 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.194>.
- Xu X, Chiung YM, Lu F, Qiu S, Ji M and Huo X. 2015. Associations of Cadmium, Bisphenol A and Polychlorinated Biphenyl Co-Exposure in Utero with Placental Gene Expression and Neonatal Outcomes. *Reproductive Toxicology* 52 : 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.02.004>.
- Yamada H, Furuta I, Kato E, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G et al. 2002. Maternal Serum and Amniotic Fluid Bisphenol A Concentrations in the Early Second Trimester. *Reproductive Toxicology* : 16 (6): 735-39. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00051-5](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00051-5).
- Ye Y, Tang Y, Xiong Y, Feng L, and Li X. 2019. Bisphenol A Exposure Alters Placentation and Causes Preeclampsia-like Features in Pregnant Mice Involved in Reprogramming of DNA Methylation of WNT2. *FASEB Journal* : 33 (2): 2732-42. <https://doi.org/10.1096/fj.201800934RRR>.
- Yuan M, Hu M, Lou Y, Wang Q, Mao L, Zhan Q and Jin F. 2018. Environmentally Relevant Levels of Bisphenol A Affect Uterine Decidualization and Embryo Implantation through the Estrogen Receptor/Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1/Epithelial Sodium Ion Channel α -Subunit Pathway in a Mouse Model. *Fertility and Sterility* 109 (4): 735-744.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.003>.
- Zhu D, Gong X, Miao L, Fang J and Zhang J. 2017. Efficient Induction of Syncytiotrophoblast Layer II Cells from Trophoblast Stem Cells by Canonical Wnt Signaling Activation. *Stem Cell Reports* 9 (6): 2034-49. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.014>.

Supplemental Material

Table S1. Primers Sequence

Figure S1. Growth and pubertal outcomes in males following gestational and lactational exposure to BPS 25 ng/kg/day

Figure S2. Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes in the RNA sequencing data based on p value $< 0, 05$ in female placentas exposed to BPS 25 ng/kg/day compared to controls

Table S1 : primers sequence

Gene	Primer	Accession Number	Amplicon Size	Use
<i>Esr1</i>	5' - CGC TCT GCC TTG ATC ACA CA -3' 5' - GCC GAG GTA CAG ATT GGCTT - 3'	NM_012689.1	191	qPCR
<i>Esr2</i>	5' - GTC CTG CTG TGA TGA ACT AC - 3' 5' - CCC TCT TTG CGT TTG GAC TA - 3'	NM_012754.3	126	qPCR
<i>Src1</i>	5' - ACA AGG CAG AAC AGT TGG ACA - 3' 5' - CAA AGG CTC TTC TTC CAG GG - 3'	NM_001395569.1	191	qPCR
<i>Src2</i>	5' - CAT ACG CCA AGA GGC ATC AC - 3' 5' - CGT AGT CTG GGA ACG GAT GAG - 3'	NM_031822.2	134	qPCR
<i>Src3</i>	5' - GCC TCA CAC CAG TTC TCT CC - 3' 5' - GAG AGG TTC CCA CAC CTT CG - 3'	NM_053454.1	133	qPCR
<i>Dnmt1</i>	5'-TCG GAG CAG ATC GAG AAG GA -3' 5' GGC CAA GTT AGG ACA CCT CC-3'	NM_053354.3	189	qPCR
<i>Dnmt3a</i>	5' CTT CTC TGA AGC CCT CGC AG -3' 5' CCT GTT CCT CTC CTT CCT TTC G-3'	NM_001003958.1	152	qPCR
<i>Dnmt3b</i>	5' ACA ACC ATT GAC TTT GCC GC -3' 5' TCA GAA GCC ATC CGT TCT CG 3'	NM_001396349.1	119	qPCR
<i>Tet1</i>	5' CTT TTA GGG GGA AAG GGG CAT 3' 5' CCC ATG ACC ACG TCT ACT GT 3'	XM_039099324.1	172	qPCR
<i>Tet2</i>	5' GGT TCC TGT TCT GCT ACG GT 3' 5' GCC CTT TGA ATG AAT CCA GCA G 3'	XM_006233347.4	113	qPCR
<i>Src2</i>	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TGTAGTTTTGAGATAAGGTTTGG GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG CTATATTCCTAAAATTAATAAATAAATAC	NM_031822.2	412	Bisulfite sequencing

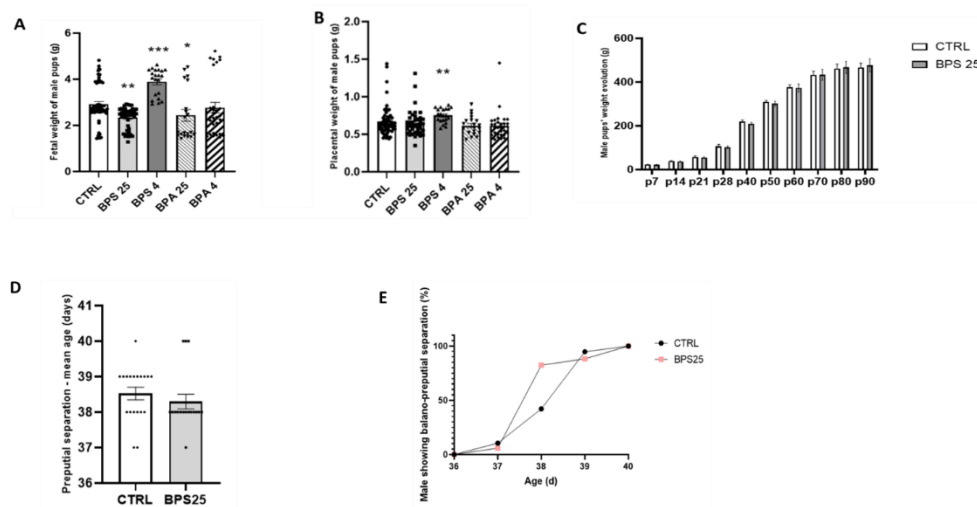


Figure S1. Male growth and pubertal outcomes following gestational and lactational exposure to BPS 25 ng/kg/day.

(A) Average male offspring weight at GD18 following exposure to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 µg/kg/day (n=15); BPA 25 ng/kg/day (n=15) or BPA 4 µg/kg/day (n=15). Data are presented as mean ± SEM.

** p-value < 0,0086 * p value : 0,0433 *** p-value 0,0007 one way ANOVA. Error bars represent standard deviation.

(B) Average male placenta weight at GD18 following exposure to corn oil (control) (n=25); BPS 25 ng/kg/day (n=25); BPS 4 µg/kg/day (n=15); BPA 25 ng/kg/day (n=15) or BPA 4 µg/kg/day (n=15). Data are presented as mean ± SEM.

** p-value 0,029 one way ANOVA. Error bars represent standard deviation.

(C) Average weight evolution in males exposed to corn oil (control) (n=9) or BPS (25 ng/kg/day) (n= 8) during gestation and lactation. Data are presented as mean ± SEM.

(D) Average age at balano preputial separation in male rats exposed during gestation and lactation to corn oil (control) (n=18) or BPS (25 ng/kg/day) (n=18). Data are presented as mean ± SEM.

p-value : 0.17 T test

(E) Cumulative percentage of male rats displaying balano-preputial separation in relation to age in males exposed to corn oil (control) (n= 18) or BPS (25 ng/kg/day) (n=18) during gestation and lactation.

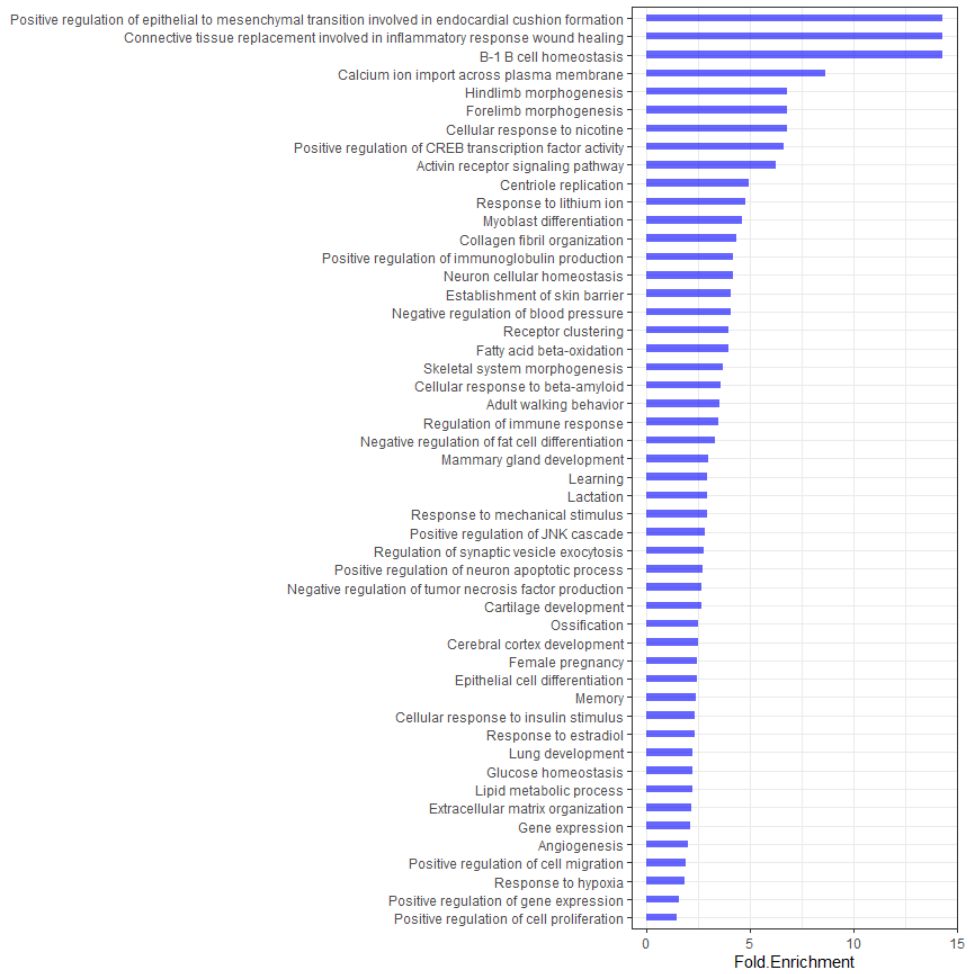


Figure S2. Gene ontology enrichment analysis of differentially expressed genes in the RNA sequencing data based on p value < 0, 05 in female placentas exposed to BPS 25 ng/kg/day compared to controls.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

1. Par quels mécanismes le Bisphénol A et le Bisphénol S altèrent-ils l'épigénome placentaire ?

Notre travail a montré que l'exposition durant la gestation à une forte dose de BPA induit des modifications de méthylation de l'ADN au sein de l'épigénome placentaire, avec un effet différent selon le sexe. L'exposition une semaine avant la conception et durant la gestation à une très faible dose de BPS induit également des modifications de méthylation de l'ADN du promoteur du gène *SRC2* au sein des placentas femelles. Les mécanismes impliqués dans ces observations restent cependant non élucidés. Notre hypothèse était que ces modifications de méthylation de l'ADN étaient associées à des modifications de l'expression des enzymes de régulation. Même si on peut s'attendre à ce que des modifications d'expression des enzymes DNA méthyltransférases soient liées à des changements de la méthylation au sein du génome de façon globale, dans la plupart des études, les modifications d'expression des DNMTs sont liées à des changements de méthylation au sein de gènes spécifiques. Par exemple, l'exposition postnatale précoce au BPA (PND1 à PND5) induit une hyperméthylation du promoteur du récepteur aux oestrogènes alpha et beta au sein des testicules à l'âge adulte, en parallèle à une augmentation de l'expression de DNMT3a et DNMT3b (Doshi et al. 2011). L'établissement du lien de causalité entre les modifications d'expression des DNMTs et les altérations de la méthylation au sein des gènes cibles est cependant rarement retrouvé dans les études à l'exception de quelques-unes d'entre elles. Par exemple, chez le rat, une étude a montré que l'exposition durant la gestation et la lactation au BPA (40 µg/kg/j) augmentait les comportements anxieux chez les femelles (évalués à PND45) (Zhou et al. 2013). Ces changements étaient associés à une augmentation de l'expression de DNMT1 en parallèle à une diminution de

l'expression de l'enzyme *Gad 67*, qui joue un rôle important dans l'inhibition GABAergique au sein de l'amygdale. En administrant un inhibiteur de la DNMT (5-aza-deoxycytidine) directement dans l'amygdale, l'expression de *Gad 67* est restaurée et le comportement est normalisé chez les rats. La question de savoir comment les PEs (en particulier le BPA) interfèrent avec l'expression des DNMTs reste tout à fait d'actualité même si on peut raisonnablement penser qu'il s'agit d'une régulation de la transcription de ces gènes à travers l'interaction des PEs avec leurs récepteurs cibles. En effet, des études ont montré que l'injection de 17 beta-oestradiol altère l'expression des enzymes DNMT de type 3, à travers son interaction avec le récepteur aux oestrogènes alpha (Jin et al. 2019; Marques et al. 2013; Zhao et al. 2010; Zhao et al. 2012). Une hypothèse est que le BPA peut modifier l'expression des DNMTs à travers son interaction avec les récepteurs aux oestrogènes. Dans nos deux modèles expérimentaux, les modifications de méthylation n'étaient pas en rapport avec des modifications d'expression des DNMTs, à l'exception d'une augmentation de l'expression de DNMT3a au sein des placentas mâles, chez qui un gain de méthylation du gène *Tnks2* avait été mis en évidence. Le gain de méthylation des gènes *Nr5a1*, *Hmx2*, *Tcnt2* et *Mamdc4* au sein des placentas femelles n'était pas associé à une modification de l'expression de DNMT3a. Cela suggère l'implication d'autres mécanismes permettant d'expliquer les altérations de méthylation de l'ADN induites par le BPA et/ou le BPS.

C'est plus récemment que les processus régulant la déméthylation active ont été décrits et notamment l'implication des enzymes TETs (Wu and Zhang 2017). Une étude *in vitro* a montré que le BPA réduit la localisation nucléaire de la protéine TET2 au sein des neurones à GNRH, sans que les effets sur la méthylation de l'ADN n'aient été étudiés (Kurian et al. 2016). Une autre étude plus récente a montré que l'exposition périnatale au BPA (depuis 2 semaines avant la conception jusqu'à la fin de la lactation) augmente l'expression de l'ARNm de l'enzyme TET2 au sein du mésencéphale (Malloy et al. 2019). L'expression de l'ARNm de *kcnq1*, un gène

soumis à empreinte, était augmentée en parallèle à celle de TET2. Dans notre étude, la diminution de la méthylation de SRC2 après exposition au BPS ne peut être expliquée par la diminution de l'expression de TET2 au sein du placenta puisque la diminution de cette dernière devrait plutôt être associée à un gain de méthylation. Cependant, les TETs enzymes jouent un rôle dans la régulation du micro environnement à l'interface materno-fœtale durant la décidualisation et les premières phases de la grossesse (Jin et al. 2022). Le rôle de l'hydroxyméthylation de l'ADN (transformation des 5- méthylcytosines en 5- hydroxyméthylcytosines par les enzymes TETs) dans la différenciation et le développement du placenta ainsi que son implication possible dans les pathologies de la grossesse telles que restriction de croissance fœtale ou pré-éclampsie commence à être étudié (Vasconcelos et al. 2023). Une étude a par exemple démontré un rôle critique de TET2 dans la régulation de la migration des cellules trophoblastiques via une déméthylation du promoteur de *MMP9*, une métalloprotéinase impliquée dans la régulation de la placentation (Li et al. 2018). Ces études illustrent l'intérêt pour les travaux futurs d'étudier d'une part l'expression des TETs après exposition au BPA et/ou au BPS mais aussi le niveau de méthylation des gènes impliqués dans la placentation qui pourraient constituer des gènes « cibles » en aval de la voie des TETs.

2. Les marqueurs épigénétiques peuvent-ils être utilisés pour améliorer l'évaluation du risque associé aux PE?

Les résultats de notre travail en ce qui concerne les effets de l'exposition précoce au BPA et au BPS sur la méthylation de l'ADN viennent renforcer les données d'autres études expérimentales et épidémiologiques illustrant l'influence de l'environnement précoce sur les modifications épigénétiques et l'implication de ces dernières dans le développement de certaines pathologies plus tard dans la vie. Ces marqueurs épigénétiques précoces apparaissent donc comme marqueurs d'un risque de pathologie ultérieure mais également comme marqueurs d'une

susceptibilité accrue par rapport à l'exposition à d'autres facteurs environnementaux. La question de prendre en compte ces marqueurs épigénétiques lors de l'évaluation de la toxicité des PE peut donc être posée. En effet, ces derniers offrent à priori une série d'avantages. Ils constituent des marqueurs précoces voire prédictifs d'une toxicité qu'il est difficile de mettre en évidence au vu des effets décalés de l'exposition aux faibles doses de PE. Les marqueurs épigénétiques permettent d'évaluer les effets des carcinogènes non génotoxiques, ces substances capables d'induire des cancers par des mécanismes secondaires qui n'altèrent pas l'intégrité du génome. Ils offrent par ailleurs un marquage précoce des effets transgénérationnels des PE. Cependant, il persiste encore quelques facteurs limitants par rapport à l'utilisation de ces biomarqueurs épigénétiques dans l'évaluation du risque lié aux PE.

Un premier point est l'établissement du lien causal entre les modifications épigénétiques identifiées après exposition aux PE et les mécanismes qui sous-tendent les effets observés sur la santé. En effet, à l'heure actuelle, la plupart des études décrivent les effets de l'exposition aux PE sur l'épigénétique et/ou le phénotype sans forcément établir de lien entre les deux observations. De plus, la plupart des études plus mécanistiques ont tendance à utiliser de fortes doses, ou en tout cas des doses supérieures à l'exposition environnementale. Deuxièmement, les données de la littérature suggèrent que les mécanismes épigénétiques sont spécifiques de l'espèce et du sexe. Cela pose la question de la transposition des données animales chez l'humain. De plus, définir la limite entre les variations normales épigénétiques adaptatives et le seuil de toxicité reste difficile, avec parfois des effets épigénétiques qui peuvent être médiés par d'autres facteurs environnementaux inhérents à l'expérimentation ou au protocole. Tous ces facteurs sont à prendre en compte dans la construction des modèles expérimentaux visant à démontrer les effets épigénétiques des PE afin que ces derniers puissent être utilisés pour une évaluation du risque.

Sur base de ces facteurs limitants, nous pouvons mettre en évidence les forces et les faiblesses de ce travail. Dans le premier modèle expérimental, nous avons décrit les effets épigénétiques placentaires différents selon le sexe de l'exposition à une forte dose de BPA sans en étudier les conséquences phénotypiques. Deux aspects de ce modèle peuvent être discutés par rapport à l'utilisation de telles données pour définir la toxicité des PEs. Le premier point qui a déjà été abordé à plusieurs reprises dans ce manuscrit est l'utilisation d'une dose élevée de BPA, en postulant que les plus fortes doses vont produire les effets les plus importants. Cela ne tient pas compte des effets non monotones de nombreux PEs ainsi que les effets observés à très faibles doses. Le deuxième point est l'utilisation d'un seul PE. En effet, nous sommes quotidiennement exposés non à un seul, mais à un mélange complexe de PEs. Ces substances associées, chacune à une dose inactive, peuvent entraîner des effets non prédits par leur étude individuelle (Christiansen et al. 2009). Les effets des PEs peuvent par exemple être synergiques : deux substances se potentialisent mutuellement, à savoir qu'elles sont plus actives à la même dose sous forme de mélanges que seules. A l'inverse, les effets des PEs peuvent être antagonistes : les effets respectifs de deux substances s'annulent lorsqu'elles sont associées. Par ailleurs, les divers PEs d'un mélange peuvent agir sur des cibles communes ou différentes. Même si les mécanismes sous tendant ces effets « cocktails » sont difficiles à étudier, la toxicité épigénétique potentielle d'une co-exposition à plusieurs PEs devra être prise en compte dans les modèles expérimentaux futurs.

Grâce à notre deuxième modèle expérimental, nous avons pris en compte la nécessité d'étudier les faibles doses de PEs et nous avons analysé les conséquences phénotypiques de cette exposition par rapport au développement placentaire et fœtal notamment, toujours en tenant compte des effets potentiellement différents selon le sexe. Comme pour la plupart des études à l'heure actuelle, même si nous avons mis en évidence des modifications de méthylation au sein du promoteur du

gène *SRC2*, nous n'avons pas pu établir de lien causal absolu entre les différentes observations. Cela pose la question de l'utilisation d'autres méthodes pour établir un lien plus robuste entre l'exposition aux PE et les effets épigénétiques au sein du placenta.

À mi-chemin entre les modèles *in vivo* et les cultures de cellules *in vitro*, les organoïdes pourraient dans le futur prendre une place de choix dans l'étude des mécanismes par lesquels les perturbateurs endocriniens affectent la santé. En effet, ces derniers sont des structures cellulaires en 3D qui ont une microarchitecture et une fonctionnalité se rapprochant de celles des tissus dont elles dérivent. Par opposition aux cultures cellulaires qui représentent un seul type cellulaire, les organoïdes ont l'avantage de représenter l'hétérogénéité cellulaire des tissus. Quelques données récentes de la littérature illustrent l'utilisation de ces derniers pour la mise en évidence des effets délétères possibles du BPA. Par exemple, grâce à un modèle d'organoïde mammaire, il a été démontré que le BPA et le BPS altèrent la microarchitecture glandulaire mammaire, en rapport avec des altérations protéomiques spécifiques à chacun d'eux (Winkler et al. 2022). A notre connaissance, les effets du BPA ou du BPS n'ont pas encore été étudiés au sein d'un organoïde développé à partir de cellules placentaires. Même si les organoïdes constituent en théorie une alternative prometteuse par rapport aux études *in vivo*, des spécificités telles que les effets différents selon le sexe par exemple, illustrent la nécessité de considérer cette approche de façon complémentaire aux études *in vivo* ou *in vitro* conventionnelles.

3. Le placenta constitue-t-il un tissu sensible comme marqueur de l'exposition aux PEs?

Dans les deux modèles expérimentaux, l'approche transcriptomique évaluant les effets du BPA et/ou du BPS sur le placenta a mis en évidence un faible nombre de gènes dont l'expression était significativement modifiée. Cela est en accord avec

les données de Mao *et al* qui avait aussi étudié les effets du BPA et du BPS sur le transcriptome placentaire (e12.5) et qui avait identifié 13 gènes dont l'expression était communément altérée par le BPA et le BPS. Un point intéressant par rapport à des perspectives de recherche concernant les effets des PEs sur le placenta qui ressort de notre étude est l'altération de l'expression de gènes spécifiques en fonction du type de substance et de la dose utilisée. Même si nous ne pouvons expliquer les mécanismes qui sous-tendent cette perturbation spécifique, cela illustre la nécessité d'étudier les effets des « substances de remplacement » *in vitro* ou *in vivo* et d'utiliser des faibles doses plus en accord avec l'exposition humaine, comme cela a déjà été discuté dans le paragraphe précédent. Une des hypothèses possibles pour expliquer les modifications d'expression d'un si faible nombre de gènes est que le placenta est un tissu très hétérogène avec plusieurs types cellulaires. Il serait intéressant d'étudier comment le BPA ou le BPS et de façon plus générale les PEs affectent le transcriptome au sein d'un type de population cellulaire placentaire et les effets que cela peut avoir sur les autres populations cellulaires. Un deuxième point est que ces modifications d'expression de l'ARNm sont variables au cours du temps et correspondent essentiellement à la réponse rapide de la cellule à des signaux environnementaux ou des changements d'homéostasie. Ils sont donc plutôt le reflet de l'exposition « actuelle » plutôt que le reflet d'une exposition passée et persistante. Même si les marqueurs épigénétiques sont caractérisés par leur caractère réversible, ces derniers sont plus à même de refléter une exposition passée à une substance. Ainsi, comme suggéré par notre premier modèle expérimental, l'analyse de l'épigénome placentaire de façon globale peut constituer la preuve de l'exposition fœtale à un ou plusieurs PEs.

4. Quid du caractère translationnel de nos recherches ?

La réponse à la question de l'utilité du modèle animal sachant que le placenta peut être collecté chez l'humain vient en partie des limitations des études

humaines existantes : la période préconceptionnelle et l'exposition paternelle au BPA sont rarement prises en compte; l'évaluation de l'exposition au BPA durant toute la grossesse reste compliquée (mesure des concentrations urinaires en BPA ?, nombre d'échantillons urinaires à collecter pendant la grossesse ?, mesure des concentrations placentaires en BPA ?, mesure des concentrations de BPA au niveau du sang de cordon ?) et les effets placentaires peuvent être différents en fonction du terme de la grossesse au moment de la collection des échantillons. De plus, il existe une variabilité de réponses au sein même du placenta en fonction de l'endroit où l'échantillon est collecté.

Sur base de ces facteurs limitants, le modèle animal garde tout son sens même si la transposition des données récoltées grâce aux modèles animaux par rapport aux effets des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine doit se faire en gardant à l'esprit les spécificités inhérentes à chaque espèce, notamment par rapport à la régulation des fonctions endocrines et de leurs effets sur les processus biologiques (Viguié et al. 2020). Mimer au mieux l'exposition humaine et en particulier de la femme enceinte aux PE dans un modèle murin pour étudier leurs effets au sein du placenta reste un grand challenge. La fenêtre d'exposition de notre deuxième modèle expérimental (pré-conception et durant la gestation) est en accord avec ce qui se passe chez la femme enceinte et en particulier couvre la période critique de l'implantation et du développement précoce du placenta, un des « outcomes » d'intérêt de ce travail. En terme de substances et de doses d'exposition, nous avons étudié le BPA et le BPS à des doses très faibles, de l'ordre du ng/kg. Se pose la question de l'exposition du fœtus dans notre modèle animal après administration de cette faible dose par voie orale à la rate gestante. En raison du faible poids des fœtus au moment de la césarienne et du peu de volume de sang disponible, nous n'avons pas pu évaluer la concentration en BPA et en BPS au sein du compartiment fœtal. Au vu de la biodisponibilité importante du BPA après administration par voie orale chez le rat et de son passage transplacentaire sous

forme conjuguée avant d'être réactivé sous forme libre au sein du compartiment fœtal (Nishikawa et al. 2010), on peut augurer dans notre modèle d'une exposition fœtale en accord avec l'exposition humaine. Il n'existe pas actuellement de données concernant le passage transplacentaire du BPS chez le rongeur. Cependant, chez le mouton, il a été montré que le transfert materno-fœtal du BPS est très faible, notamment en comparaison à celui du BPA. En dépit de cela, l'exposition fœtale au BPS est sensiblement la même qu'au BPA en raison du fait que le BPS et son principal métabolite, le BPS glucuronide, sont lentement éliminés du compartiment fœtal en raison d'un passage placentaire fœto-maternel du BPS limité et de la faible vitesse de réactivation du BPS glucuronide en BPS (Grandin et al. 2018). Ces données ont été confirmées dans un modèle de placenta humain perfusé avec des faibles transferts materno-fœtal et fœto-maternel du BPS comparés à ceux du BPA (Grandin et al. 2019). Cela illustre l'intérêt de prendre en compte d'autres modèles animaux dans l'étude de la perturbation endocrinienne, en association avec ceux plus classiquement utilisés. Même si cela complexifie encore la construction des modèles animaux, la question de l'exposition à des mixtures de plusieurs PE à faibles doses nous paraît importante également à prendre en considération.

En terme de placentation, même si les placentas humain et murin sont tous deux hémochoriaux et que certaines caractéristiques sont communes en terme d'invasion du myomètre et de remodelage des artères utérines par les cellules trophoblastiques (Hemberger et al. 2020), il existe des différences à la fois structurelles et fonctionnelles qui sont à prendre en compte dans la transposition des résultats obtenus chez le rongeur chez l'humain. Par ailleurs, d'autres modèles peuvent être considérés lorsqu'il s'agit d'étudier les effets de l'exposition aux PE sur le placenta. Comme illustré ci-dessus, le modèle mouton permet une étude précise de l'exposition au sein du compartiment fœtal et maternel grâce à la possibilité de mettre en place un cathéter dans la circulation maternelle et fœtale.

Ainsi, il est possible d'exposer directement le fœtus à un PE en court-circuitant le métabolisme maternel et ainsi mimer au mieux l'exposition du fœtus humain. Un autre avantage du modèle mouton est qu'il permet une collecte du placenta sans que la grossesse ne soit interrompue et rendrait ainsi possible le suivi de la descendance exposée. Par contre, le fait qu'il s'agisse de grossesse unique rend d'un point de vue pratique les études très longues.

Même si les marques épigénétiques et transcriptomiques sont espèce, tissu et cellule spécifiques, l'utilisation du modèle animal permet d'identifier certains gènes candidats dont l'expression et/ou la méthylation est affectée après exposition au BPA et/ou au BPS. Une possibilité serait d'étudier ce gène candidat au sein des placentas humains associés à un type de pathologies tel que pré-éclampsie ou retard de croissance intra-utérin et ainsi établir potentiellement un lien entre la survenue de cette pathologie et une exposition préalable au BPA et ou au BPS.

5. En pratique, quelles recommandations faire aux femmes enceintes par rapport à l'exposition aux PEs ?

Comme abordé à plusieurs reprises dans ce manuscrit, une attention particulière doit être portée à la diminution de l'exposition de la femme enceinte et du nouveau-né aux perturbateurs endocriniens. Par ailleurs, les effets décrits de l'exposition à certains PEs au niveau des spermatozoïdes du père illustrent l'importance d'élargir ces recommandations au futur père. Une première étape dans la démarche de la prévention de l'exposition des femmes enceintes ou des futurs pères aux PEs est l'évaluation de leur perception des risques liés à l'exposition aux PEs. Une étude menée en France a montré que la perception du risque lié aux PEs par les femmes enceintes était significativement associée à la connaissance qu'elles avaient de la problématique ou encore à sa médiatisation (Rouillon S et al. 2018). Il semble donc que le personnel de santé a un rôle fondamental à jouer dans l'information donnée concernant les effets suspectés des

PEs sur la santé. Le tableau III reprend quelques questions que le médecin peut inciter les futurs parents, la femme enceinte ou la jeune maman à se poser et ainsi discuter avec ces derniers des comportements qu'ils peuvent modifier afin de réduire leur exposition aux PEs.

Tableau III : Questions visant à évaluer le risque d'exposition aux PEs durant les fenêtres de susceptibilité et inciter à modifier les comportements quotidiens et appliquer ainsi un principe de précaution (adapté de Fudvoye et al. 2014b)

- Est-ce que j'utilise beaucoup de produits cosmétiques ? Est-ce que je m'assure qu'ils ne contiennent pas de parabènes ?
- Est-ce que je prête attention à privilégier les aliments et les boissons contenus en récipients en verre plutôt qu'en plastique ou en métal quand j'ai le choix ?
- Est-ce que je réchauffe les aliments au micro-onde dans des récipients en plastique ?
- Est-ce que les biberons et récipients utilisés pour nourrir mon jeune enfant sont en plastique sans garantie qu'ils soient exempts de bisphénols ?
- Est-ce que je consomme des aliments sans m'informer, quand c'est possible, de leurs conditions de culture ou d'élevage ?
- Est-ce que les jouets en plastiques ou caoutchouc que je mets à disposition de mon enfant sont exempts de bisphénol et de phtalates ?
- Est-ce que j'envisage de repeindre la chambre de mon (futur) enfant ou d'utiliser des produits d'entretien (vernis,...) en grande quantité ?
- Est-ce que j'envisage de renouveler du mobilier en tissu ou cuir ou des fournitures comme du tapis plain ou des rideaux ?
- Est-ce que j'ai l'habitude d'utiliser dans mon logement ou ma voiture des désodorisants d'intérieur et/ ou des insecticides en tablettes ou en sprays ?

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adewale H, Jefferson W, Newbold R, Patisaul H. 2009. Neonatal Bisphenol-a Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology without Impairing Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Biology of Reproduction* 81 (4): 690-99. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078261>.
- Adoamnei E, Mendiola J, Vela-Soria F, Fernández MF, Olea N, Jørgensen N, et al. 2018. Urinary bisphenol A concentrations are associated with reproductive parameters in young men. *Environ Res.* 161:122–28. [10.1016/j.envres.2017.11.002](https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.002)
- Adu-Gyamfi E, Rosenfeld C, Tuteja G. 2022. The Impact of Bisphenol A on the Placenta†. *Biology of Reproduction* 106 (5): 826-34. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaac001>.
- Ahn YA, Baek H, Choi M, Park J, Son J, Seo H, et al. 2020. Adipogenic Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol S (BPS) in Adult F1 Male Mice. *The Science of the Total Environment* 728: 138759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138759>.
- Ahsan N, Ullah H, Ullah W, Jahan S. 2018. Comparative Effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the Development of Female Reproductive System in Rats; a Neonatal Exposure Study. *Chemosphere* 197 : 336-43. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.118>.
- Aikawa H, Koyama S, Matsuda M, Nakahashi K, Akazome Y, Mori T. 2004. Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell Tissue Res.* 315:119–24. doi: [10.1007/s00441-003-0806-1](https://doi.org/10.1007/s00441-003-0806-1) 34.
- Aker A, Ferguson K, Rosario Z, Mukherjee B, Alshawabkeh A, Cordero J, et al. 2019. The Associations between Prenatal Exposure to Triclocarban, Phenols and Parabens with Gestational Age and Birth Weight in Northern Puerto Rico. *Environmental Research* 169: 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.030>.
- Akingbemi B, Sottas C, Koulova A, Klinefelter G, Hardy M. 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. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1174>.
- Angle B, Do RP, Ponzi D, Stahlhut R, Drury B, Nagel S, et al. 2013. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reproductive toxicology* 42: 10.1016/j.reprotox.2013.07.017. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.07.017>.
- Arbuckle T, Davis K, Marro L, Fisher M, Legrand M, LeBlanc A, et al. 2014. Phthalate and Bisphenol A Exposure among Pregnant Women in Canada—Results from the MIREC Study. *Environment International* 68 : 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.010>.
- Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, et al. 2006. Alpha-Fetoprotein Protects the Developing Female Mouse Brain from Masculinization and

- Defeminization by Estrogens. *Nature Neuroscience* 9 (2): 220-26. <https://doi.org/10.1038/nn1624>.
- Balaton B, Brown C. 2021. Contribution of Genetic and Epigenetic Changes to Escape from X-Chromosome Inactivation. *Epigenetics & Chromatin* 14 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00404-9>.
- Bamigboye A, Morris J. 2003. Oestrogen Supplementation, Mainly Diethylstilbestrol, for Preventing Miscarriages and Other Adverse Pregnancy Outcomes. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003 (3): CD004353. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004353>.
- Bannister A, Kouzarides T. 2011. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Research* 21 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Barker D. 1998. In Utero Programming of Chronic Disease. *Clinical Science (London, England: 1979)* 95 (2): 115-28.
- Barker D. 2006. Adult Consequences of Fetal Growth Restriction. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 49 (2): 270-83. <https://doi.org/10.1097/00003081-200606000-00009>.
- Barr D, Bishop A, Needham L. 2007. Concentrations of Xenobiotic Chemicals in the Maternal-Fetal Unit. *Reproductive Toxicology* 23 (3): 260-66. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.03.003>.
- Bateman H, Patisaul H. 2008. Disrupted Female Reproductive Physiology Following Neonatal Exposure to Phytoestrogens or Estrogen Specific Ligands Is Associated with Decreased GnRH Activation and Kisspeptin Fiber Density in the Hypothalamus. *NeuroToxicology* 29 (6): 988-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.06.008>.
- Berger K, Eskenazi B, Kogut K, Parra K, Lustig R, Greenspan L, et al. 2018. Association of Prenatal Urinary Concentrations of Phthalates and Bisphenol A and Pubertal Timing in Boys and Girls. *Environmental Health Perspectives* 126 (9): 97004. <https://doi.org/10.1289/EHP3424>.
- Bisphenol A: a global market overview. 2016. <https://industry-experts.com/verticals/files/articles/cp021-bisphenol-a-a-global-market-overview.pdf>
- Bisphenol A (FT 279). Caractéristiques - Fiche toxicologique - INRS 2022. https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_279
- Bird A, Wolffe A. 1999. Methylation-Induced Repression--Belts, Braces, and Chromatin. *Cell* 99 (5): 451-54. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81532-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81532-9).
- Bisconti M, Simon JF, Grassi S, Leroy B, Martinet B, Arcolia V, et al. 2021. Influence of Risk Factors for Male Infertility on *Sperm* Protein Composition. *Int J Mol Sci.* 22(23):13164. doi:10.3390/ijms222313164.
- Blackledge N, Klose R. 2011. CpG Island Chromatin: A Platform for Gene Regulation. *Epigenetics* 6 (2): 147-52. <https://doi.org/10.4161/epi.6.2.13640>.
- Bloom M, Kim D, Vom Saal F, Taylor J, Cheng G, Lamb J, et al. 2011. Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 96(3):672-7.
- Boon P, Van der Voet H, Van Raaij M, Van Klaveren J. 2008. Cumulative Risk Assessment of the Exposure to Organophosphorus and Carbamate Insecticides in the Dutch Diet. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46 (9): 3090-98. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.083>.

- Boucher J, Boudreau A, Ahmed S, Atlas E. 2015. In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environmental Health Perspectives* 123 (12): 1287-93. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409143>.
- Braun J, Kalkbrenner A, Calafat A, Bernert J, Ye X, Silva M, et al. 2011. Variability and Predictors of Urinary Bisphenol A Concentrations during Pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 119 (1): 131-37. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002366>.
- Braun J, Lanphear B, Calafat A, Deria S, Khoury J, Howe C, et al. 2014. Early-Life Bisphenol a Exposure and Child Body Mass Index: A Prospective Cohort Study. *Environmental Health Perspectives* 122 (11): 1239-45. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408258>.
- Bromer J, Zhou Y, Taylor M, Doherty L, Taylor H. 2010. Bisphenol-A Exposure in Utero Leads to Epigenetic Alterations in the Developmental Programming of Uterine Estrogen Response. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (7): 2273-80. <https://doi.org/10.1096/fj.09-140533>.
- Brulport A, Vaiman D, Chagnon MC, Le Corre L. 2020. Obesogen Effect of Bisphenol S Alters MRNA Expression and DNA Methylation Profiling in Male Mouse Liver. *Chemosphere* 241 : 125092. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125092>.
- Buck Louis G, Sundaram R, Sweeney A, Schisterman E, Maisog J, Kannan K. 2014 Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: the longitudinal investigation of fertility and the environment (LIFE) study. *Fertil Steril.* 101:1359–66. [10.1016/j.fertnstert.2014.01.022](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.022).
- Buckley J, Herring A, Wolff M, Calafat A, Engel S. 2016. Prenatal exposure to environmental phenols and childhood fat mass in the Mount Sinai Children’s Environmental Health Study. *Environment international* 91: 350-56. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.019>.
- Burstyn I, Martin J, Beesoon S, Bamforth F, Li Q, Yasui Y, et al. 2013. Maternal Exposure to Bisphenol-A and Fetal Growth Restriction: A Case-Referent Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (12): 7001-14. <https://doi.org/10.3390/ijerph10127001>.
- Burton G, Jauniaux E, Charnock-Jones S. 2010. The Influence of the Intrauterine Environment on Human Placental Development. *The International Journal of Developmental Biology* 54 (2-3): 303-12. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082764gb>.
- Calafat A, Kuklennyk Z, Reidy J, Caudill S, Ekong J, Needham L. 2005. Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population. *Environmental Health Perspectives* 113 (4): 391-95. <https://doi.org/10.1289/ehp.7534>.
- Calafat A, Ye X, Wong LY, Reidy J, et Needham L. 2008. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-Tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives* 116 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>.
- Cano-Nicolau J, Vaillant C, Pellegrini E, Charlier T, Kah O, Coumailleau P. 2016. Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. *Frontiers in Neuroscience* 10: 112. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00112>.
- Cao-Lei L, de Rooij S, King S, Matthews S, Metz G, Roseboom T, et al. 2020. Prenatal Stress and Epigenetics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 117: 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.016>.

- Cartron PF, Pacaud R, Salbert G. 2015. Méthylation/déméthylation de l'ADN et expression du génome. *Revue Francophone des Laboratoires* 2015. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)30158-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)30158-1).
- Carwile J, Ye X, Zhou X, Calafat A, Michels K. 2011. Canned Soup Consumption and Urinary Bisphenol A: A Randomized Crossover Trial. *JAMA* 306 (20): 2218-20. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1721>.
- Casas M, Chevrier C, Den Hond E, Fernandez M, Pierik F, Philippat C, et al. 2013. Exposure to Brominated Flame Retardants, Perfluorinated Compounds, Phthalates and Phenols in European Birth Cohorts: ENRIECO Evaluation, First Human Biomonitoring Results, and Recommendations. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216 (3): 230-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.05.009>.
- Casas M, Valvi D, Ballesteros-Gomez A, Gascon M, Fernandez M, Garcia-Esteban R, et al. 2016. Exposure to Bisphenol A and Phthalates during Pregnancy and Ultrasound Measures of Fetal Growth in the INMA-Sabadell Cohort. *Environmental Health Perspectives* 124 (4): 521-28. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409190>.
- Caserta D, Bordi G, Ciardo F, Marci R, La Rocca C, Tait S, et al. 2013. The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecol Endocrinol.* 29(5):444-7.
- Castellini C, Totaro M, Parisi A, Settimio A, Lucente L, Cordeschi G, et al. 2020. Bisphenol A and Male Fertility: Myths and Realities. *Front Endocrinol* 11 :353. doi: 10.3389/fendo.2020.00353
- Chen M, Tang R, Fu G, Xu B, Zhu P, Qiao S, et al. 2013. Association of exposure to phenols and idiopathic male infertility. *J Hazard Mater.* 250-1:115-21. [10.1016/j.jhazmat.2013.01.061](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.061)
- Chen Y, Fang J, Ren L, Fan R, Zhang J, Liu G, et al. 2018. Urinary Bisphenol Analogues and Triclosan in Children from South China and Implications for Human Exposure. *Environmental Pollution* 238: 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.031>.
- Chen P, Liu C, Zhang M, Miao Y, Cui FP, Deng YL, et al. 2022. Associations between urinary bisphenol A and its analogues and semen quality: A cross-sectional study among Chinese men from an infertility clinic. *Environ Int* 161:107132. doi: 10.1016/j.envint.2022.107132.1.
- Choi YJ, Lee Y, Hong YC, Cho J, Lee KS, Ho Shin C, et al. 2020. Effect of Prenatal Bisphenol A Exposure on Early Childhood Body Mass Index through Epigenetic Influence on the Insulin-like Growth Factor 2 Receptor (IGF2R) Gene. *Environment International* 143: 105929. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105929>.
- Chou WC, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, Chuang CY. 2011. Biomonitoring of Bisphenol A Concentrations in Maternal and Umbilical Cord Blood in Regard to Birth Outcomes and Adipokine Expression: A Birth Cohort Study in Taiwan. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 10 : 94. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-94>.
- Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenkamp A, Hass U. 2009. Synergistic Disruption of External Male Sex Organ Development by a Mixture of Four Antiandrogens. *Environmental Health Perspectives* 117 (12): 1839-46. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900689>.
- Collet S, Picard-Hagen N, Lacroix M, Puel S, Viguié C, Bousquet-Melou A, et al. 2015. Allometric Scaling for Predicting Human Clearance of Bisphenol A. *Toxicology*

- and *Applied Pharmacology* 284 (3): 323-29. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.024>.
- Covaci A, Den Hond E, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H, et al. 2015. Urinary BPA Measurements in Children and Mothers from Six European Member States: Overall Results and Determinants of Exposure. *Environmental Research* 141: 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.008>.
- Dalkan C, Uncu M, Duran S, Bahçeciler N. 2020. Association of Cord Blood Bisphenol A (BPA) with Cord Blood Adiponectin, Leptin, Fetal Growth; Adiposity and Neonatal Complications in a Newborn Cohort. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 33 (15): 2588-93. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1555808>.
- Dan J, Chen T. 2022. Genetic Studies on Mammalian DNA Methyltransferases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1389: 111-36. https://doi.org/10.1007/978-3-031-11454-0_5.
- da Silva B, Pietrobon C, Bertasso I, Lopes B, Carvalho J, Peixoto-Silva N, et al. 2019. Short and Long-Term Effects of Bisphenol S (BPS) Exposure during Pregnancy and Lactation on Plasma Lipids, Hormones, and Behavior in Rats. *Environmental Pollution* 250 : 312-22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.100>.
- Deaton A, Bird A. 2011. CpG Islands and the Regulation of Transcription. *Genes & Development* 25 (10): 1010-22. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>.
- Defossez O, Kirsh O, Naciri I. Epigenetique, Encyclopaedia Universalis (en ligne). <https://www.universalis.fr/encyclopedie/epigenetique/>
- Dekant W, Völkel W. 2008. Human Exposure to Bisphenol A by Biomonitoring: Methods, Results and Assessment of Environmental Exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228 (1): 114-34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.008>.
- de Wildt S, Kearns G, Leeder J, van den Anker J. 1999. Glucuronidation in Humans. Pharmacogenetic and Developmental Aspects. *Clinical Pharmacokinetics* 36 (6): 439-52. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936060-00005>.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice L, Hauser R, Prins G, Soto A, et al. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* 30 (4): 293-342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.
- Ding G, Wang C, Vinturache C, Zhao S, Pan R, Han W, et al. 2017. Prenatal Low-Level Phenol Exposures and Birth Outcomes in China. *The Science of the Total Environment* 607-608: 1400-1407. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.084>.
- Dodge L, Williams P, Williams M, Missmer S, Toth T, Calafat A, et al. 2015. Paternal urinary concentrations of parabens and other phenols in relation to reproductive outcomes among couples from a fertility clinic. *Environ Health Perspect*. 123:665–71. [10.1289/ehp.1408605](https://doi.org/10.1289/ehp.1408605)
- Doerge D, Twaddle N, Woodling K, Fisher J. 2010. Pharmacokinetics of Bisphenol A in Neonatal and Adult Rhesus Monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.009>.
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle R. 2007. Maternal Nutrient Supplementation Counteracts Bisphenol A-Induced DNA Hypomethylation in Early Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (32): 13056-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703739104>.
- Dong W, He J, Wang J, Sun W, Sun Y, Yu J. 2022. Bisphenol A Exposure Advances Puberty Onset by Changing Kiss1 Expression Firstly in Arcuate Nucleus at Juvenile Period in

- Female Rats. *Reproductive Toxicology* 110: 141-49. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.04.005>.
- Doshi T, Mehta S, Dighe V, Balasiner N, Vanage G. 2011. Hypermethylation of Estrogen Receptor Promoter Region in Adult Testis of Rats Exposed Neonatally to Bisphenol A. *Toxicology* 289 (2-3): 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>.
- Edlow A, Chen M, Smith N, Lu C, McElrath T. 2012. Fetal Bisphenol A Exposure: Concentration of Conjugated and Unconjugated Bisphenol A in Amniotic Fluid in the Second and Third Trimesters. *Reproductive Toxicology* 34 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.03.009>.
- EFSA Panel on Food Contact Materials EF and PA (CEF). 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. EFSA J. 2015 13.
- Ehrlich S, Williams P, Missmer S, Flaws J, Berry K, Calafat A, et al. 2012. Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization. *Environ Health Perspect*. 120(7):978–83.
- Ehrlich S, Calafat A, Humblet O, Smith T, Hauser R. 2014. Handling of Thermal Receipts as a Source of Exposure to Bisphenol A. *JAMA* 311 (8): 859-60. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.283735>.
- Engel S, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff M. 2006. Xenobiotic Phenols in Early Pregnancy Amniotic Fluid. *Reproductive Toxicology* 21 (1): 110-12. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.07.007>.
- EPA/Integrated Risk Information System (IRIS), U.S. Environmental Protection Agency, Chemical Assessment Summary, Bisphenol A; CASRN 80-05-7, 1988
- Fall C, Kumaran K. 2019. Metabolic Programming in Early Life in Humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 374 (1770): 20180123. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0123>.
- Ferguson K, Peterson K, Lee J, Mercado-García A, Blank-Goldenberg C, Téllez-Rojo M. 2014. Prenatal and Peripubertal Phthalates and Bisphenol A in Relation to Sex Hormones and Puberty in Boys. *Reproductive Toxicology* 47: 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.002>.
- Ferguson S, Law C, Kissling G. 2014. Developmental Treatment with Ethinyl Estradiol, but Not Bisphenol A, Causes Alterations in Sexually Dimorphic Behaviors in Male and Female Sprague Dawley Rats. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 140 (2): 374-92. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu077>.
- Ferguson K, Meeker J, Cantonwine D, Chen YH, Mukherjee B, McElrath T. 2016. Urinary Phthalate Metabolite and Bisphenol A Associations with Ultrasound and Delivery Indices of Fetal Growth. *Environment International* 94: 531-37. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.013>.
- Ferguson K, Meeker J, Cantonwine D, Mukherjee B, Pace G, Weller D, et al. 2018. Environmental Phenol Associations with Ultrasound and Delivery Measures of Fetal Growth. *Environment International* 112: 243-50. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.011>.
- Fernández M, Bianchi M, Lux-Lantos V, Libertun C. 2009. Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Reproductive Parameters and Gonadotropin Releasing Hormone Signaling in Female Rats. *Environmental Health Perspectives* 117 (5): 757-62. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800267>.

- Filipowicz W, Bhattacharyya S, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by MicroRNAs: Are the Answers in Sight? *Nature Reviews. Genetics* 9 (2): 102-14. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>.
- Flaws J, Damdimopoulou P, Patisaul H, Gore A, Raetzman L, Vandenberg L. 2020. IPEN, PLASTIQUES, SANTÉ ET PRODUITS CHIMIQUES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS. https://ipen.org/sites/default/files/documents/edc_guide_2020_v1_6bw-fr.pdf
- Franssen D, Gérard A, Hennuy B, Donneau AF, Bourguignon JP, Parent AS. 2016. Delayed Neuroendocrine Sexual Maturation in Female Rats After a Very Low Dose of Bisphenol A Through Altered GABAergic Neurotransmission and Opposing Effects of a High Dose. *Endocrinology* 157 (5): 1740-50. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1937>.
- Fudvoye J, Bourguignon JP, Parent AS. 2014a. Endocrine-Disrupting Chemicals and Human Growth and Maturation: A Focus on Early Critical Windows of Exposure. *Vitamins and Hormones* 94: 1-25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00001-8>.
- Fudvoye J, Franssen D, Naveau E, Pinson A, Gerard A, Bourguignon JP et al. 2014b. Endocrine disruption: a challenge in research, public health and clinical practice. *Rev Med Liege*. 2014; 69 Spec No: 25-30.
- Fujimoto V, Kim D, von Saal F, Lamb J, Taylor J, Bloom M. 2011. Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 95(5):1816–9.
- Gabory A, Attig L, Junien C. 2009. Sexual Dimorphism in Environmental Epigenetic Programming. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1-2): 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.015>.
- Gauderat G, Picard-Hagen N, Toutain PL, Servien R, Viguié C, Puel S, et al. 2017. Prediction of Human Prenatal Exposure to Bisphenol A and Bisphenol A Glucuronide from an Ovine Semi-Physiological Toxicokinetic Model. *Scientific Reports* 7 (1): 15330. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15646-5>.
- Gauster M, Hiden U, van Poppel M, Frank S, Wadsack C, Hauguel-de Mouzon S, et al. 2011. Dysregulation of Placental Endothelial Lipase in Obese Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* 60 (10): 2457-64. <https://doi.org/10.2337/db10-1434>.
- Gayrard V, Lacroix M, Grandin F, Collet S, Mila H, Viguié C, et al. 2019. Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs. *Environmental Health Perspectives* 127 (7): 77005. <https://doi.org/10.1289/EHP4599>.
- Gayrard V, Lacroix M, Gély C, Grandin F, Léandri R, Bouchard M, et al. 2020. Toxicokinetics of Bisphenol S in Rats for Predicting Human Bisphenol S Clearance from Allometric Scaling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 386 : 114845. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114845>.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. 2012. A Review of Dietary and Non-Dietary Exposure to Bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 50 (10): 3725-40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>.
- Geens T, Bruckers L, Covaci A, Schoeters G, Fierens T, Sioen I, et al. 2014. Determinants of bisphenol A and phthalate metabolites in urine of Flemish adolescents. *Environ Res* 134:110-7. doi: 10.1016/j.envres.2014.07.020.
- Ghayda R, Williams P, Chavarro J, Ford J, Souter I, Calafat A, et al. 2020. Urinary bisphenol S concentrations: Potential predictors of and associations with semen quality

- parameters among men attending a fertility center. *Environ Int* 131:105050. doi: 10.1016/j.envint.2019.105050.
- Ginsberg G, Rice D. 2009. Does Rapid Metabolism Ensure Negligible Risk from Bisphenol A? *Environmental Health Perspectives* 117 (11): 1639-43. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901010>.
- Goldstone A, Chen Z, Perry M, Kannan K, Louis G. 2015. Urinary bisphenol A and semen quality, the LIFE study. *Reprod Toxicol*. 51:7–13. 10.1016/j.reprotox.2014.11.003
- Goodman J, McConnell E, Sipes G, Witorsch R, Slayton T, Yu C, et al. 2006. An Updated Weight of the Evidence Evaluation of Reproductive and Developmental Effects of Low Doses of Bisphenol A. *Critical Reviews in Toxicology* 36 (5): 387-457. <https://doi.org/10.1080/10408440600758317>.
- Goodrich J, Ingle M, Domino S, Treadwell M, Dolinoy D, Burant C, et al. 2019. First Trimester Maternal Exposures to Endocrine Disrupting Chemicals and Metals and Fetal Size in the Michigan Mother-Infant Pairs Study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 10 (4): 447-58. <https://doi.org/10.1017/S204017441800106X>.
- Goodson A, Robin H, Summerfiel W, Cooper I. 2004. Migration of bisphenol A from can coatings--effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit Contam* 21(10):1015-26. doi: 10.1080/02652030400011387.
- Gopalakrishnan S, Van Emburgh B, Robertson K. 2008. DNA Methylation in Development and Human Disease. *Mutation Research* 647 (1-2): 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.08.006>.
- Gore A, Chappell V, Fenton S, Flaws J, Nadal A, Prins G, et al. 2015. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews* 36 (6): E1-150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- Gounden V, Warasally M, Magwai T, Naidoo R, Chuturgoon A. 2019. A Pilot Study: Bisphenol-A and Bisphenol-A Glucuronide Levels in Mother and Child Pairs in a South African Population. *Reproductive Toxicology* 89: 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.008>.
- Grandin F, Picard-Hagen N, Gayrard V, Puel S, Viguié C, Toutain PL, et al. 2017. Development of an On-Line Solid Phase Extraction Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Technique Coupled to Tandem Mass Spectrometry for Quantification of Bisphenol S and Bisphenol S Glucuronide: Applicability to Toxicokinetic Investigations. *Journal of Chromatography. A* 1526: 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.020>.
- Grandin F, Lacroix M, Gayrard V, Gauderat G, Mila H, Toutain PL, et al. 2018. Bisphenol S Instead of Bisphenol A: Toxicokinetic Investigations in the Ovine Materno-Feto-Placental Unit. *Environment International* 120 : 584-92. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.019>.
- Grandin F, Lacroix MZ, Gayrard V, Viguié C, Mila H, de Place A, et al. 2019. Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure ? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere* 221:471-478. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.065.
- Grandjean P, Jensen A. 2004. Breastfeeding and the Weanling's Dilemma. *American Journal of Public Health* 94 (7): 1075; author reply 1075-1076. <https://doi.org/10.2105/ajph.94.7.1075>.

- Guo J, Zhang J, Wu C, Xiao H, Lv S, Lu D, et al. 2020. Urinary Bisphenol A Concentrations and Adiposity Measures at Age 7 Years in a Prospective Birth Cohort. *Chemosphere* 251: 126340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126340>.
- Gys C, Bastiaensen M, Bruckers L, Colles A, Govarts E, Rodriguez Martin L, et al. 2021. Determinants of Exposure Levels of Bisphenols in Flemish Adolescents. *Environmental Research* 193: 110567. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110567>.
- Hakkola J, Tanaka E, Pelkonen O. 1998. Developmental Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Human Liver. *Pharmacology & Toxicology* 82 (5): 209-17. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1998.tb01427.x>.
- Hales C, Barker D. 1992. Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: The Thrifty Phenotype Hypothesis. *Diabetologia* 35 (7): 595-601. <https://doi.org/10.1007/BF00400248>.
- Hanna C, Bloom M, Robinson W, Kim D, Parsons P, vom Saal F, et al. 2012. DNA Methylation Changes in Whole Blood Is Associated with Exposure to the Environmental Contaminants, Mercury, Lead, Cadmium and Bisphenol A, in Women Undergoing Ovarian Stimulation for IVF. *Human Reproduction* 27 (5): 1401-10. <https://doi.org/10.1093/humrep/des038>.
- Hanson M, Gluckman P. 2011. Developmental Origins of Noncommunicable Disease: Population and Public Health Implications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (6 Suppl): 1754S-1758S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001206>.
- Harley K, Schall R, Chevrier J, Tyler K, Aguirre H, Bradman A, et al. 2013. Prenatal and Postnatal Bisphenol A Exposure and Body Mass Index in Childhood in the CHAMACOS Cohort. *Environmental Health Perspectives* 121 (4): 514-20. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205548>.
- Hart R, Doherty D, Keelan J, Minaee N, Thorstensen E, Dickinson J, et al. 2018. The impact of antenatal Bisphenol A exposure on male reproductive function at 20–22 years of age. *Reprod Biomed Online*. 36:340–7. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.11.009
- Heard E, Martienssen R. 2014. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell* 157 (1): 95-109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>.
- Heindel J, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, Grandjean P, Gray K, et al. 2015. Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. *Endocrinology* 156 (10): 3416-21. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1394>.
- Hemberger M, Hanna C, Dean W. 2020. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nature Reviews Genetics* 21: 27-43.
- Herbst A, Ulfelder H, Poskanzer D. 1971. Adenocarcinoma of the Vagina. Association of Maternal Stilbestrol Therapy with Tumor Appearance in Young Women. *The New England Journal of Medicine* 284 (15): 878-81. <https://doi.org/10.1056/NEJM197104222841604>.
- Hill C, Myers J, Vandenberg L. 2018. Nonmonotonic Dose-Response Curves Occur in Dose Ranges That Are Relevant to Regulatory Decision-Making. *Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society* 16 (3): 1559325818798282. <https://doi.org/10.1177/1559325818798282>.
- Hill P, Leitch H, Requena C, Sun Z, Amouroux R, Roman-Trufero M, et al. 2018. Epigenetic Reprogramming Enables the Transition from Primordial Germ Cell to Gonocyte. *Nature* 555 (7696): 392-96. <https://doi.org/10.1038/nature25964>.

- Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins G. 2006. Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Research* 66 (11): 5624-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0516>.
- Hoepner L, Whyatt R, Widen E, Hassoun A, Oberfield S, Mueller N, et al. 2016. Bisphenol A and Adiposity in an Inner-City Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives* 124 (10): 1644-50. <https://doi.org/10.1289/EHP205>.
- Honma S, Suzuki A, Buchanan D, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. 2002. Low Dose Effect of in Utero Exposure to Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Female Mouse Reproduction. *Reproductive Toxicology* 16 (2): 117-22. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00006-0](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00006-0).
- Hong J, Chen F, Wang X, Bai Y, Zhou R, Li Y, et al. 2016. Exposure of preimplantation embryos to low-dose bisphenol A impairs testes development and suppresses histone acetylation of StAR promoter to reduce production of testosterone in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 427:101–11. doi: 10.1016/j.mce.2016.03.009 38.
- Hoover R, Hyer M, Pfeiffer R, Adam E, Bond B, Cheville A, et al. 2011. Adverse Health Outcomes in Women Exposed in Utero to Diethylstilbestrol. *The New England Journal of Medicine* 365 (14): 1304-14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013961>.
- Hormann A, Vom Saal F, Nagel S, Stahlhut R, Moyer C, Ellersieck M, et al. 2014. Holding Thermal Receipt Paper and Eating Food after Using Hand Sanitizer Results in High Serum Bioactive and Urine Total Levels of Bisphenol A (BPA). *PLoS One* 9 (10): e110509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110509>.
- Hotchkiss A, Rider C, Blystone C, Wilson V, Hartig P, Ankley G, et al. 2008. Fifteen Years after “Wingspread”--Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We Are Today and Where We Need to Go. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 105 (2): 235-59. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn030>.
- Howdeshell K, Hotchkiss A, Thayer K, Vandenberg J, vom Saal F. 1999. Exposure to Bisphenol A Advances Puberty. *Nature* 401 (6755): 763-64. <https://doi.org/10.1038/44517>.
- Hu J, Zhao H, Braun J, Zheng T, Zhang B, Xia W, et al. 2019. Associations of Trimester-Specific Exposure to Bisphenols with Size at Birth: A Chinese Prenatal Cohort Study. *Environmental Health Perspectives* 127 (10): 107001. <https://doi.org/10.1289/EHP4664>.
- Huang RP, Liu ZH, Yuan SF, Yin H, Dang Z, Wu PX. 2017. Worldwide Human Daily Intakes of Bisphenol A (BPA) Estimated from Global Urinary Concentration Data (2000-2016) and Its Risk Analysis. *Environmental Pollution* 230 : 143-52. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.026>.
- Huang W, Zhao C, Zhong H, Zhang S, Xia Y, Cai Z. 2019. Bisphenol S Induced Epigenetic and Transcriptional Changes in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Environmental Pollution* 246 : 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.084>.
- Huang YF, Chang CH, Chen PJ, Lin IH, Tsai YA, Chen CF, et al. 2021. Prenatal Bisphenol a Exposure, DNA Methylation, and Low Birth Weight: A Pilot Study in Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (11): 6144. <https://doi.org/10.3390/ijerph18116144>.

- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. 2002. Determination of Bisphenol A Concentrations in Human Biological Fluids Reveals Significant Early Prenatal Exposure. *Human Reproduction* 17 (11): 2839-41. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2839>.
- Imanishi S, Manabe N, Nishizawa H, Morita M, Sugimoto M, Iwahori M, et al. 2003. Effects of Oral Exposure of Bisphenol A on mRNA Expression of Nuclear Receptors in Murine Placentae Assessed by DNA Microarray. *The Journal of Reproduction and Development* 49 (4): 329-36. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.329>.
- Jacobson M, Woodward M, Bao W, Liu B, Trasande L. 2019. Urinary Bisphenols and Obesity Prevalence Among U.S. Children and Adolescents. *J. Endocr. Soc.* 3(9):1715-1726. doi: 10.1210/js.2019-00201.
- Jin X, Li Y, Guo Y, Jia Y, Qu H, Lu Y, et al. 2019. ER α Is Required for Suppressing OCT4-Induced Proliferation of Breast Cancer Cells via DNMT1/ISL1/ERK Axis. *Cell Proliferation* 52 (4): e12612. <https://doi.org/10.1111/cpr.12612>.
- Jin H, Xie J, Mao L, Zhao M, Bai X, Wen J, et al. 2020. Bisphenol Analogue Concentrations in Human Breast Milk and Their Associations with Postnatal Infant Growth. *Environmental Pollution* 259: 113779. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113779>.
- Jin M, Ji J, Chen X, Zhou Y, Wang D, Liu A. 2022. The Emerging Role of TET Enzymes in the Immune Microenvironment at the Maternal-Fetal Interface during Decidualization and Early Pregnancy. *Frontiers in Immunology* 13: 1066599. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1066599>.
- Junge K, Leppert B, Jahreis S, Wissenbach D, Feltens R, Grützmann K, et al. 2018. MEST Mediates the Impact of Prenatal Bisphenol A Exposure on Long-Term Body Weight Development. *Clinical Epigenetics* 10: 58. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0478-z>.
- Kaminsky Z, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh G, Wong A, et al. 2009. DNA Methylation Profiles in Monozygotic and Dizygotic Twins. *Nature Genetics* 41 (2): 240-45. <https://doi.org/10.1038/ng.286>.
- Kang ER, Iqbal K, Tran D, Rivas G, Singh P, Pfeifer G, et al. 2011. Effects of Endocrine Disruptors on Imprinted Gene Expression in the Mouse Embryo. *Epigenetics* 6 (7): 937-50. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16067>.
- Kataria A, Levine D, Wertenteil S, Vento S, Xue J, Rajendiran K, et al. 2017. Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children. *Pediatr. Res.* 81(6):857-864. doi: 10.1038/pr.2017.16.
- Kelsey G. 2007. Genomic Imprinting--Roles and Regulation in Development. *Endocrine Development* 12: 99-112. <https://doi.org/10.1159/000109637>.
- Khmiri I, Côté J, Mantha M, Khemiri R, Lacroix M, Gely C, et al. 2020. Toxicokinetics of Bisphenol-S and Its Glucuronide in Plasma and Urine Following Oral and Dermal Exposure in Volunteers for the Interpretation of Biomonitoring Data. *Environment International* 138 : 105644. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105644>.
- Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, et al. 2005. Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 84 (2): 249-59. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi074>.

- Kiwitt-Cárdenas J, Adoamnei E, Arense-Gonzalo JJ, Sarabia-Cos L, Vela-Soria F, Fernández MF, et al. 2021. Associations between urinary concentrations of bisphenol A and sperm DNA fragmentation in young men. *Environ. Res.* 199:111289. doi: 10.1016/j.envres.2021.111289.
- Knez J, Kranvogel R, Breznik BP, Vončina E, Vlaisavljević V. 2014. Are urinary bisphenol A levels in men related to semen quality and embryo development after medically assisted reproduction? *Fertil Steril.* 101:215–21. 10.1016/j.fertnstert.2013.09.030
- Kolla S, McSweeney D, Pokharel A, Vandenberg L. 2019. Bisphenol S Alters Development of the Male Mouse Mammary Gland and Sensitizes It to a Peripubertal Estrogen Challenge. *Toxicology* 424: 152234. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.06.005>.
- Korevaar T, Muetzel R, Medici M, Chaker L, Jaddoe V, de Rijke Y, et al. 2016. Association of Maternal Thyroid Function during Early Pregnancy with Offspring IQ and Brain Morphology in Childhood: A Population-Based Prospective Cohort Study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 4 (1): 35-43. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00327-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00327-7).
- Kurian J, Louis S, Keen K, Wolfe A, Terasawa E, Levine J. 2016. The Methylcytosine Dioxygenase Ten-Eleven Translocase-2 (Tet2) Enables Elevated GnRH Gene Expression and Maintenance of Male Reproductive Function. *Endocrinology* 157 (9): 3588-3603. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1087>.
- La Merrill M, Vandenberg L, Smith M, Goodson W, Browne P, Patisaul H, et al. 2020. Consensus on the Key Characteristics of Endocrine-Disrupting Chemicals as a Basis for Hazard Identification. *Nature Reviews. Endocrinology* 16 (1): 45-57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>.
- Lager S, Powell T. 2012. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *Journal of Pregnancy* 2012: 179827. <https://doi.org/10.1155/2012/179827>.
- Lakind J, Naiman D. 2008. Bisphenol A (BPA) Daily Intakes in the United States: Estimates from the 2003-2004 NHANES Urinary BPA Data. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 18 (6): 608-15. <https://doi.org/10.1038/jes.2008.20>.
- LaKind J, Pollock T, Naiman D, Kim S, Nagasawa A, Clarke J. 2019. Factors Affecting Interpretation of National Biomonitoring Data from Multiple Countries: BPA as a Case Study. *Environmental Research* 173: 318-29. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.047>.
- La Rocca C, Tait S, Guerranti C, Busani L, Ciardo F, Bergamasco B, et al. 2014. Exposure to endocrine disruptors and nuclear receptor gene expression in infertile and fertile women from different Italian areas. *Int J Environ Res Public Health.* 11(10):10146–64.
- Lassen T, Frederiksen H, Jensen T, Petersen J, Joensen U, Main K, et al. 2014. Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. *Environ Health Perspect.* 122:478–84. 10.1289/ehp.1307309.
- Le Fol V, Aït-Aïssa S, Sonavane M, Porcher JM, Balaguer P, Cravedi JP, et al. 2017. In Vitro and in Vivo Estrogenic Activity of BPA, BPF and BPS in Zebrafish-Specific Assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142 : 150-56. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.009>.
- Lee BE, Park H, Hong YC, Ha M, Kim Y, Chang N, et al. 2014. Prenatal Bisphenol A and Birth Outcomes: MOCEH (Mothers and Children’s Environmental Health) Study.

- International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217 (2-3): 328-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.005>.
- Lee JH, Ahn C, Kang H, Hong EJ, Hyun SH, Choi KC, et al. 2016. Effects of Octylphenol and Bisphenol A on the Metal Cation Transporter Channels of Mouse Placentas. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (10): 965. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100965>.
- Lee YM, Hong YC, Ha M, Kim Y, Park H, Kim HS, et al. 2018. Prenatal Bisphenol-A Exposure Affects Fetal Length Growth by Maternal Glutathione Transferase Polymorphisms, and Neonatal Exposure Affects Child Volume Growth by Sex: From Multiregional Prospective Birth Cohort MOCEH Study. *The Science of the Total Environment* 612: 1433-41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.317>.
- Lehmler HJ, Liu B, Gadogbe M, Bao W. 2018. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013-2014. *ACS Omega* 3 (6): 6523-32. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824>.
- Lempradl A. 2020. Germ Cell-Mediated Mechanisms of Epigenetic Inheritance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 97: 116-22. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.07.012>.
- Li X, Wu C, Shen Y, Wang K, Tang L, Zhou M, et al. 2018. Ten-Eleven Translocation 2 Demethylates the MMP9 Promoter, and Its down-Regulation in Preeclampsia Impairs Trophoblast Migration and Invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 293 (26): 10059-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001265>.
- Liang F, Huo X, Wang W, Li Y, Zhang J, Feng Y, et al. 2020. Association of Bisphenol A or Bisphenol S Exposure with Oxidative Stress and Immune Disturbance among Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Women. *Chemosphere* 257: 127035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127035>.
- Liao C, Liu F, Guo Y, Moon HB, Nakata H, Wu Q, et al. 2012. Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environmental Science & Technology* 46 (16): 9138-45. <https://doi.org/10.1021/es302004w>.
- Liu J, Li J, Wu Y, Zhao Y, Luo F, Li S, et al. 2017. Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum. *Environmental Science & Technology* 51 (4): 2456-63. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05718>.
- Liu B, Lehmler HJ, Sun Y, Xu G, Sun Q, Snetselaar L, et al. 2019. Association of Bisphenol A and Its Substitutes, Bisphenol F and Bisphenol S, with Obesity in United States Children and Adolescents. *Diabetes Metab J* 43(1):59-75. doi: 10.4093/dmj.2018.0045.
- Losa-Ward S, Todd K, McCaffrey K, Tsutsui K, Patisaul H. 2012. Disrupted Organization of RFamide Pathways in the Hypothalamus Is Associated with Advanced Puberty in Female Rats Neonatally Exposed to Bisphenol A. *Biology of Reproduction* 87 (2): 28. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100826>.
- Lu L, Zhan T, Ma M, Xu C, Wang J, Zhang C, et al. 2018. Thyroid Disruption by Bisphenol S Analogues via Thyroid Hormone Receptor β : In Vitro, in Vivo, and Molecular Dynamics Simulation Study. *Environmental Science & Technology* 52 (11): 6617-25. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00776>.

- Ma Y, Xia W, Wang D, Wan Y, Xu B, Chen X, et al. 2013. Hepatic DNA Methylation Modifications in Early Development of Rats Resulting from Perinatal BPA Exposure Contribute to Insulin Resistance in Adulthood. *Diabetologia* 56 (9): 2059-67. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2944-7>.
- Malloy M, Kochmanski J, Jones T, Colacino J, Goodrich J, Dolinoy D, et al. 2019. Perinatal Bisphenol A Exposure and Reprogramming of Imprinted Gene Expression in the Adult Mouse Brain. *Front Genet.* 10 : 951. <https://doi: 10.3389/fgene.2019.00951>.
- McCabe C, Anderson O, Montrose L, Neier K, Dolinoy DC. 2017. Sexually Dimorphic Effects of Early-Life Exposures to Endocrine Disruptors: Sex-Specific Epigenetic Reprogramming as a Potential Mechanism. *Current Environmental Health Reports* 4 (4): 426-38. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0170-z>
- Maitre L, de Bont J, Casas M, Robinson O, Aasvang G, Agier L, et al. 2018. Human Early Life Exposome (HELIX) Study: A European Population-Based Exposome Cohort. *BMJ Open* 8 (9): e021311. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-021311>.
- Mao J, Jain A, Denslow N, Nouri MZ, Chen S, Wang T, et al. 2020. Bisphenol A and Bisphenol S Disruptions of the Mouse Placenta and Potential Effects on the Placenta-Brain Axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (9): 4642-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.
- Marques M, Laflamme L, Gaudreau L. 2013. Estrogen Receptor α Can Selectively Repress Dioxin Receptor-Mediated Gene Expression by Targeting DNA Methylation. *Nucleic Acids Research* 41 (17): 8094-8106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt595>.
- Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. 2002. Developmental Increases in Rat Hepatic Microsomal UDP-Glucuronosyltransferase Activities toward Xenoestrogens and Decreases during Pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 110 (2): 193-96. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110193>.
- Matthews J, Twomey K, Zacharewski T. 2001. In Vitro and in Vivo Interactions of Bisphenol A and Its Metabolite, Bisphenol A Glucuronide, with Estrogen Receptors Alpha and Beta. *Chemical Research in Toxicology* 14 (2): 149-57. <https://doi.org/10.1021/tx0001833>.
- Ménard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, et al. 2014. Perinatal Exposure to a Low Dose of Bisphenol A Impaired Systemic Cellular Immune Response and Predisposes Young Rats to Intestinal Parasitic Infection. *PLoS One* 9 (11): e112752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112752>.
- Mendiola J, Jørgensen N, Andersson A-M, Calafat AM, Ye X, Redmon JB, et al. 2010. Are environmental levels of bisphenol A associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect.* 118:1286–91. [10.1289/ehp.1002037](https://doi.org/10.1289/ehp.1002037).
- Meng Z, Wang D, Liu W, Li R, Yan S, Jia M, et al. 2019a. Perinatal Exposure to Bisphenol S (BPS) Promotes Obesity Development by Interfering with Lipid and Glucose Metabolism in Male Mouse Offspring. *Environmental Research* 173: 189-98. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.038>.
- Meng Z, Zhu W, Wang D, Li R, Jia M, Yan S, et al. 2019b. 1H NMR-Based Serum Metabolomics Analysis of the Age-Related Metabolic Effects of Perinatal Exposure to BPA, BPS, BPF, and BPAF in Female Mice Offspring. *Environmental Science and Pollution Research International* 26 (6): 5804-13. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4004-9>.

- Messerschmidt D, Knowles B, Solter D. 2014. DNA Methylation Dynamics during Epigenetic Reprogramming in the Germline and Preimplantation Embryos. *Genes & Development* 28 (8): 812-28. <https://doi.org/10.1101/gad.234294.113>.
- Micevych P, Wong A, Mittelman-Smith M. 2015. Estradiol Membrane-Initiated Signaling and Female Reproduction. *Comprehensive Physiology* 5 (3): 1211-22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140056>.
- Michałowicz J. 2014. Bisphenol A--Sources, Toxicity and Biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (2): 738-58. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.
- Miller S, Huppi P, Mallard C. 2016. The Consequences of Fetal Growth Restriction on Brain Structure and Neurodevelopmental Outcome. *The Journal of Physiology* 594 (4): 807-23. <https://doi.org/10.1113/JP271402>.
- Miura R, Araki A, Minatoya M, Miyake K, Chen ML, Kobayashi S, et al. 2019. An Epigenome-Wide Analysis of Cord Blood DNA Methylation Reveals Sex-Specific Effect of Exposure to Bisphenol A. *Scientific Reports* 9 (1): 12369. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48916-5>.
- Molina-Molina J, Jiménez-Díaz I, Fernández M, Rodríguez-Carrillo A, Peinado F, Mustieles V, et al. 2019. Determination of Bisphenol A and Bisphenol S Concentrations and Assessment of Estrogen- and Anti-Androgen-like Activities in Thermal Paper Receipts from Brazil, France, and Spain. *Environmental Research* 170: 406-15. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.046>.
- Molangiri A, Varma S, Satyavani M, Kambham S, Duttaroy A, Basak S. 2022. Prenatal exposure to bisphenol S and bisphenol A differentially affects male reproductive system in the adult offspring. *Food and Chemical Toxicology* 167 : 113292. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113292a7>.
- Montrose L, Padmanabhan V, Goodrich J, Domino S, Treadwell M, Meeker J, et al. 2018. Maternal Levels of Endocrine Disrupting Chemicals in the First Trimester of Pregnancy Are Associated with Infant Cord Blood DNA Methylation. *Epigenetics* 13 (3): 301-9. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1448680>.
- Müller J, Meyer N, Santamaria C, Schumacher A, Luque E, Zenclussen M, et al. 2018. Bisphenol A Exposure during Early Pregnancy Impairs Uterine Spiral Artery Remodeling and Provokes Intrauterine Growth Restriction in Mice. *Scientific Reports* 8 (1): 9196. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27575-y>.
- Munn S, Goumenou M. 2013. Key scientific issues relevant to the identification and characterisation of endocrine disrupting substances—Report of the Endocrine Disrupters Expert Advisory Group. *Toxicology Letters* 221: S170. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.372>.
- Murray T, Maffini M, Ucci A, Sonnenschein C, Soto A. 2007. Induction of Mammary Gland Ductal Hyperplasias and Carcinoma in Situ Following Fetal Bisphenol A Exposure. *Reproductive Toxicology* 23 (3): 383-90. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.10.002>.
- Mustieles V, Williams P, Fernandez M, Mínguez-Alarcón L, Ford J, Calafat A, et Environment and Reproductive Health (EARTH) Study Team. 2018. « Maternal and Paternal Preconception Exposure to Bisphenols and Size at Birth ». *Human Reproduction* 33 (8): 1528-37. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey234>.

- Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usami K, Ono H. 2001. Reproductive Effects in Male and Female Rats of Neonatal Exposure to Genistein. *Reproductive Toxicology* 15 (4): 399-411. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(01\)00141-1](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(01)00141-1).
- Nah W, Park M, Gye M. 2011. Effects of Early Prepubertal Exposure to Bisphenol A on the Onset of Puberty, Ovarian Weights, and Estrous Cycle in Female Mice. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 38 (2): 75-81. <https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.2.75>.
- Nahar M, Liao C, Kannan K, Harris C, Dolinoy D. 2015. In Utero Bisphenol A Concentration, Metabolism, and Global DNA Methylation across Matched Placenta, Kidney, and Liver in the Human Fetus. *Chemosphere* 124: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.071>.
- Naulé L, Picot M, Martini M, Parmentier C, Hardin-Pouzet H, Keller M, et al. 2014. Neuroendocrine and Behavioral Effects of Maternal Exposure to Oral Bisphenol A in Female Mice. *The Journal of Endocrinology* 220 (3): 375-88. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0607>.
- Navarro-Lafuente F, Adoamnei E, Arenal-Gonzalo J, Prieto-Sánchez M, Sánchez-Ferrer M, Parrado A, et al. 2022. Maternal Urinary Concentrations of Bisphenol A during Pregnancy Are Associated with Global DNA Methylation in Cord Blood of Newborns in the “NELA” Birth Cohort. *The Science of the Total Environment* 838 (Pt 4): 156540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156540>.
- Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, et al. 2004. Effects of Maternal Xenoestrogen Exposure on Development of the Reproductive Tract and Mammary Gland in Female CD-1 Mouse Offspring. *Reproductive Toxicology* 18 (6): 803-11. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.05.002>.
- Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. 2005. Effects of Prepubertal Exposure to Xenoestrogen on Development of Estrogen Target Organs in Female CD-1 Mice. *In Vivo* 19 (3): 487-94.
- Nishikama M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. 2010. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ Health Perspectives* 118(9): 1196–1203. doi: 10.1289/ehp.0901575
- Nishiyama A, Nakanishi M. 2021. Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer. *Trends in Genetics: TIG* 37 (11): 1012-27. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.05.002>.
- Oh J, Choi J, Ahn YA, Kim S. 2018. Pharmacokinetics of Bisphenol S in Humans after Single Oral Administration. *Environment International* 112: 127-33. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.020>.
- Oh-McGinnis R, Bogutz A, Lefebvre L. 2011. Partial Loss of Ascl2 Function Affects All Three Layers of the Mature Placenta and Causes Intrauterine Growth Restriction. *Developmental Biology* 351 (2): 277-86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.01.008>.
- Okano M, Xie S, Li E. 1998. Cloning and Characterization of a Family of Novel Mammalian DNA (Cytosine-5) Methyltransferases. *Nature Genetics* 19 (3): 219-20. <https://doi.org/10.1038/890>.
- Oliveira I, Romano R, de Campos P, Cavallin M, Oliveira C, Romano M, et al. 2017. Delayed Onset of Puberty in Male Offspring from Bisphenol A-Treated Dams Is Followed by the Modulation of Gene Expression in the Hypothalamic–Pituitary–Testis Axis in

- Adulthood. *Reproduction, Fertility and Development* 29 (12): 2496-2505. <https://doi.org/10.1071/RD17107>.
- Ouyang F, Zhang GH, Du K, Shen L, Ma R, Wang X, et al. 2020. Maternal Prenatal Urinary Bisphenol A Level and Child Cardio-Metabolic Risk Factors: A Prospective Cohort Study. *Environmental Pollution* 265: 115008. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115008>.
- Pacyga D, Sathyanarayana S, Strakovsky R. 2019. Dietary Predictors of Phthalate and Bisphenol Exposures in Pregnant Women. *Advances in Nutrition* 10 (5): 803-15. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz029>.
- Pan Y, Deng M, Li J, Du B, Lan S, Liang X, et al. 2020. Occurrence and Maternal Transfer of Multiple Bisphenols, Including an Emerging Derivative with Unexpectedly High Concentrations, in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environmental Science & Technology* 54 (6): 3476-86. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00206>.
- Panagiotidou E, Zerva S, Mitsiou D, Alexis M, Kitraki E. 2014. Perinatal Exposure to Low-Dose Bisphenol A Affects the Neuroendocrine Stress Response in Rats. *The Journal of Endocrinology* 220 (3): 207-18. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0416>.
- Panchenko P, Lemaire M, Fneich S, Voisin S, Jouin M, Junien C, et al. 2015. Epigénétique et Nutrition : impacts de l'alimentation maternelle sur le développement placentaire et la santé de la descendance. *Biologie* 209 : 175-87. <https://doi.org/10.1051/jbio/2015021>.
- Papuchova H, Latos P. 2022. Transcription factor networks in trophoblast development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 79. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04363-6>.
- Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek N, Toppari J, Bourguignon JP. 2003. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. *Endocrine Reviews* 24 (5): 668-93. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0019>.
- Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gérard A, Bourguignon JP. 2015. Developmental Variations in Environmental Influences Including Endocrine Disruptors on Pubertal Timing and Neuroendocrine Control: Revision of Human Observations and Mechanistic Insight from Rodents. *Frontiers in Neuroendocrinology* 38: 12-36. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.12.004>.
- Peillex C, Kerever A, Lachhab A, Pelletier M. 2021. Bisphenol A, Bisphenol S and Their Glucuronidated Metabolites Modulate Glycolysis and Functional Responses of Human Neutrophils. *Environmental Research* 196: 110336. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110336>.
- Pemberton H, Franklyn J, Kilby M. 2005. Thyroid Hormones and Fetal Brain Development. *Minerva Ginecologica* 57 (4): 367-78.
- Perera L, Li Y, Coons L, Houtman R, van Beuningen R, Goodwin B, et al. 2017. Binding of Bisphenol A, Bisphenol AF, and Bisphenol S on the Androgen Receptor: Coregulator Recruitment and Stimulation of Potential Interaction Sites. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 44 : 287-302. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.020>.
- Philippat C, Botton J, Calafat A, Ye X, Charles M, Slama R. 2014. Prenatal Exposure to Phenols and Growth in Boys. *Epidemiology* 25 (5): 625-35. <https://doi.org/10.1097/EDE.000000000000132>.

- Philippat C, Heude B, Botton J, Alfaidy N, Calafat A, Slama R. 2019. Prenatal Exposure to Select Phthalates and Phenols and Associations with Fetal and Placental Weight among Male Births in the EDEN Cohort (France). *Environmental Health Perspectives* 127 (1): 017002. <https://doi.org/10.1289/EHP3523>.
- Philips E, Jaddoe V, Asimakopoulos A, Kannan K, Steegers E, Santos S, et al. 2018. Bisphenol and Phthalate Concentrations and Its Determinants among Pregnant Women in a Population-Based Cohort in the Netherlands, 2004-5. *Environmental Research* 161: 562-72. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.051>.
- Philips E, Kahn L, Jaddoe V, Shao Y, Asimakopoulos A, Kannan K et al. 2018. First Trimester Urinary Bisphenol and Phthalate Concentrations and Time to Pregnancy: A Population-Based Cohort Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 103(9):3540-3547. doi: 10.1210/jc.2018-00855.
- Pinney S, Mesaros C, Snyder N, Busch C, Xiao R, Aijaz S, et al. 2017. Second Trimester Amniotic Fluid Bisphenol A Concentration Is Associated with Decreased Birth Weight in Term Infants. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 67: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.007>.
- Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. 2012. Urinary Levels of Bisphenol A, Triclosan and 4-Nonylphenol in a General Belgian Population. *Environment International* 48: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.07.003>.
- Prasanth G, Divya L, Sadasivan C. 2010. Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *J. Appl. Toxicol.* 30: 769-74; doi:10.1002/jat.1570.
- Pu Y, Gingrich J, Steibel J, Veiga-Lopez A. 2017. Sex-Specific Modulation of Fetal Adipogenesis by Gestational Bisphenol A and Bisphenol S Exposure. *Endocrinology* 158 (11): 3844-58. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00615>.
- Qie Y, Qin W, Zhao K, Liu C, Zhao L, Guo LH. 2021. Environmental Estrogens and Their Biological Effects through GPER Mediated Signal Pathways. *Environmental Pollution* 278 : 116826. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116826>.
- Qiu J, Sun Y, Sun W, Wang Y, Fan T, Yu J. 2020. Neonatal Exposure to Bisphenol A Advances Pubertal Development in Female Rats. *Molecular Reproduction and Development* 87 (4): 503-11. <https://doi.org/10.1002/mrd.23329>.
- Radford E, Isganaitis E, Jimenez-Chillaron J, Schroeder J, Molla M, Andrews S, et al. 2012. An Unbiased Assessment of the Role of Imprinted Genes in an Intergenerational Model of Developmental Programming. *PLoS Genetics* 8 (4): e1002605. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002605>.
- Research and Markets 2016. Bisphenol A- a global market overview. http://www.researchandmarkets.com/research/4xx8j9/bisphenola_a
- Rey R, Picard J. 1998. Embryology and Endocrinology of Genital Development. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12 (1): 17-33. [https://doi.org/10.1016/s0950-351x\(98\)80427-8](https://doi.org/10.1016/s0950-351x(98)80427-8).
- Rahman M, Kwon W, Karmakar P, Yoon S, Ryu B, Pang M. 2017. Gestational exposure to bisphenol A affects the function and proteome profile of F1 spermatozoa in adult mice. *Environ Health Perspect.* 125:238-45. doi: 10.1289/EHP378
- Rocha B, Asimakopoulos A, Honda M, da Costa N, Barbosa R, Barbosa F, et al. 2018. Advanced Data Mining Approaches in the Assessment of Urinary Concentrations of Bisphenols, Chlorophenols, Parabens and Benzophenones in Brazilian Children and

- Their Association to DNA Damage. *Environment International* 116 : 269-77. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.023>.
- Rochester J, Bolden A. 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental Health Perspectives* 123 (7): 643-50. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>.
- Roseboom T, van der Meulen J, Ravelli A, Osmond C, Barker D, Bleker O. 2001. Effects of Prenatal Exposure to the Dutch Famine on Adult Disease in Later Life: An Overview. *Twin Research: The Official Journal of the International Society for Twin Studies* 4 (5): 293-98. <https://doi.org/10.1375/1369052012605>.
- Rouillon S, El Houazzani H, Rabouan S, Migeot V, Albouy-Latly M. 2018. Determinants of Risk Perception Related to Exposure to Endocrine Disruptors during Pregnancy: A Qualitative and Quantitative Study on French Women. *Int J Environ Res Public Health*. 15(10): 2231. doi: 10.3390/ijerph15102231
- Rubin B, Soto AM. 2009. Bisphenol A: Perinatal Exposure and Body Weight. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1-2): 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.023>.
- Rudel R, Gray J, Engel C, Rawsthorne T, Dodson R, Ackerman J, 2011. Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. *Environmental Health Perspectives* 119 (7): 914-20. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003170>.
- Ruiz-Pino F, Miceli D, Franssen D, Vazquez M, Farinetti A, Castellano J, et al. 2019. Environmentally Relevant Perinatal Exposures to Bisphenol A Disrupt Postnatal Kiss1/NKB Neuronal Maturation and Puberty Onset in Female Mice. *Environmental Health Perspectives* 127 (10): 107011. <https://doi.org/10.1289/EHP5570>.
- Ryan B, Hotchkiss A, Crofton K, Gray E. 2010. In Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A, in Contrast to Ethinyl Estradiol, Does Not Alter Sexually Dimorphic Behavior, Puberty, Fertility, and Anatomy of Female Rats. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 114 (1): 133-48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp266>.
- Ryu D, Pang W, Adegoke E, Rahman M, Park Y, Pang M. 2022. Abnormal histone replacement following BPA exposure affects spermatogenesis and fertility sequentially. *Environ. Int.* 170:107617. doi: 10.1016/j.envint.2022.107617.
- Vom Saal F, Vandenberg L. 2020. Update on the Health Effects of Bisphenol A: Overwhelming Evidence of Harm. *Endocrinology* 162 (3): bqaa171. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa171>.
- Safi-Stibler S, Gabory A. 2020. Epigenetics and the Developmental Origins of Health and Disease: Parental Environment Signalling to the Epigenome, Critical Time Windows and Sculpting the Adult Phenotype. *Seminars in Cell & Developmental Biology, SI: Chromatin dynamics in regeneration*, 97: 172-80. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.09.008>.
- Salian S, Doshi T, Vanage G. 2009. Impairment in Protein Expression Profile of Testicular Steroid Receptor Coregulators in Male Rat Offspring Perinatally Exposed to Bisphenol A. *Life Sciences* 85 (1-2): 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.04.005>.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness C, Paul M, Chahoud I. 2002. Parent Bisphenol A Accumulation in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environmental Health Perspectives* 110 (11): A703-707. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241091>.

- Schrager S, Potter B. 2004. Diethylstilbestrol Exposure. *American Family Physician* 69 (10): 2395-2400.
- Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, 2008. Role of Retrotransposon-Derived Imprinted Gene, Rtl1, in the Feto-Maternal Interface of Mouse Placenta. *Nature Genetics* 40 (2): 243-48. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.51>.
- Selevan S, Kimmel C, Mendola P. 2000. Identifying Critical Windows of Exposure for Children's Health. *Environmental Health Perspectives* 108 Suppl 3: 451-55. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3451>.
- Shi M, Sekulovski N, MacLean J, Hayashi K. 2017. Effects of Bisphenol A Analogues on Reproductive Functions in Mice. *Reproductive Toxicology* 73: 280-91. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.134>.
- Shi M, Sekulovski N, MacLean J, Hayashi K. 2018. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice *Toxicol Sci* 163(2):620-631. doi: 10.1093/toxsci/kfy061.
- Shi M, Sekulovski N, MacLean J, Whorton A, Hayashi K. 2019a. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Female Reproductive Functions in Mice. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 168 (2): 561-71. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz014>.
- Shi M, Whorton A, Sekulovski N, MacLean J, Hayashi K. 2019b. Prenatal Exposure to Bisphenol A, E, and S Induces Transgenerational Effects on Male Reproductive Functions in Mice. *Toxicological Sciences* 172 (2): 303-15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz207>.
- Sibley C, Brownbill P, Dilworth M, Glazier J. 2010. Review: Adaptation in Placental Nutrient Supply to Meet Fetal Growth Demand: Implications for Programming. *Placenta* 31 Suppl: S70-74. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.020>.
- Skakkebaek N, Rajpert-De Meyts E, Main K. 2001. Testicular Dysgenesis Syndrome: An Increasingly Common Developmental Disorder with Environmental Aspects. *Human Reproduction* 16 (5): 972-78. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>.
- Skinner M. 2011. Environmental Epigenetic Transgenerational Inheritance and Somatic Epigenetic Mitotic Stability. *Epigenetics* 6 (7): 838-42. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16537>.
- Slob W, Pieters M. 1998. A Probabilistic Approach for Deriving Acceptable Human Intake Limits and Human Health Risks from Toxicological Studies: General Framework. *Risk Analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis* 18 (6): 787-98. <https://doi.org/10.1023/b:rian.0000005924.18154.60>.
- Smallwood S, Kelsey G. 2012. De Novo DNA Methylation: A Germ Cell Perspective. *Trends in Genetics: TIG* 28 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>.
- Smith Z, Meissner A. 2013. The Simplest Explanation: Passive DNA Demethylation in PGCs. *The EMBO Journal* 32 (3): 318-21. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.349>.
- Snijder C, Heederik D, Pierik F, Hofman A, Jaddoe V, Koch H, et al. 2013. Fetal Growth and Prenatal Exposure to Bisphenol A: The Generation R Study. *Environmental Health Perspectives* 121 (3): 393-98. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205296>.
- Sohoni P, Sumpster J. 1998. Several Environmental Oestrogens Are Also Anti-Androgens. *The Journal of Endocrinology* 158 (3): 327-39. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580327>.

- Sol C, van Zwol-Janssens C, Philips E, Asimakopoulos A, Martinez-Moral M, Kannan K, et al. 2021. Maternal bisphenol urine concentrations, fetal growth and adverse birth outcomes: A population-based prospective cohort. *Environ. Health*. 20(1):60. doi: 10.1186/s12940-021-00747-6.
- SommE, Schwitzgebel V, Toulotte A, Cederroth C, Combescure C, Nef S, et al. 2009. « Perinatal Exposure to Bisphenol a Alters Early Adipogenesis in the Rat ». *Environmental Health Perspectives* 117 (10): 1549-55. <https://doi.org/10.1289/ehp.11342>.
- Soncin F, Natale D, Parast M. 2015. Signaling Pathways in Mouse and Human Trophoblast Differentiation: A Comparative Review. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 72 (7): 1291-1302. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1794-x>.
- Song X, Miao M, Zhou X, Li D, Tian Y, Liang H, et al. 2019. Bisphenol A Exposure and Sperm ACHE Hydroxymethylation in Men. *Int J Environ Res Public Health*. 8;16(1):152. doi: 10.3390/ijerph16010152.
- Song X, Zhou X, Yang F, Liang H, Wang Z, Li R, et al.2020. Association between Prenatal Bisphenol a Exposure and Promoter Hypermethylation of CAPS2, TNFRSF25, and HKR1 Genes in Cord Blood. *Environmental Research* 190: 109996. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109996>.
- Song X, Wang Z, Zhang Z, Miao M, Liu J, Luan M, et al. 2021. Differential Methylation of Genes in the Human Placenta Associated with Bisphenol A Exposure. *Environmental Research* 200 : 111389. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111389>.
- Song Y, Xie P, Cai Z. 2017. Metabolism of Bisphenol S in Mice after Oral Administration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, décembre. <https://doi.org/10.1002/rcm.8051>.
- Staples C, van der Hoeven N, Clark K, Mihaich E, Woelz J, Hentges S. 2018. Distributions of Concentrations of Bisphenol A in North American and European Surface Waters and Sediments Determined from 19 Years of Monitoring Data. *Chemosphere* 201: 448-58. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.175>.
- Stefanidou M, Maravelias C, Spiliopoulou C. 2009. Human Exposure to Endocrine Disruptors and Breast Milk. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets* 9 (3): 269-76. <https://doi.org/10.2174/187153009789044374>.
- Stowell C, Barvian K, Young P, Bigsby R, Verdugo D, Bertozzi C, et al. 2006. A Role for Sulfation-Desulfation in the Uptake of Bisphenol a into Breast Tumor Cells. *Chemistry & Biology* 13 (8): 891-97. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.06.016>.
- Sun H, Xu L-C, Chen J-F, Song L, Wang X-R. 2006. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor--mediated reporter gene. *Food Chem. Toxicol.* 44:1916–21; doi:10.1016/j.fct.2006.06.013.
- Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C, Bartolomei M. 2013. Bisphenol a Exposure Disrupts Genomic Imprinting in the Mouse. *PLoS Genetics* 9 (4): e1003401. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003401>.
- Swedenborg E, Rüegg J, Mäkelä S, Pongratz I. 2009. Endocrine Disruptive Chemicals: Mechanisms of Action and Involvement in Metabolic Disorders. *Journal of Molecular Endocrinology* 43 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0132>.
- Tachibana T, Wakimoto Y, Nakamuta N, Phichitraslip T, Wakitani S, Kusakabe K, et al. 2007. Effects of Bisphenol A (BPA) on Placentation and Survival of the Neonates in Mice.

- The Journal of Reproduction and Development* 53 (3): 509-14. <https://doi.org/10.1262/jrd.18171>.
- Tait S, Tassinari R, Maranghi F, Mantovani A. 2015. Bisphenol A Affects Placental Layers Morphology and Angiogenesis during Early Pregnancy Phase in Mice. *Journal of Applied Toxicology* : 35 (11): 1278-91. <https://doi.org/10.1002/jat.3176>.
- Tang WY, Morey L, Cheung YY, Birch L, Prins G, Ho Sm. 2012. Neonatal Exposure to Estradiol/Bisphenol A Alters Promoter Methylation and Expression of Nsbp1 and Hpcal1 Genes and Transcriptional Programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the Rat Prostate Gland throughout Life. *Endocrinology* 153 (1): 42-55. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1308>.
- Tang R, Chen MJ, Ding GD, Chen XJ, Han XM, Zhou K, et al. 2013. Associations of Prenatal Exposure to Phenols with Birth Outcomes. *Environmental Pollution* 178 : 115-20. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.023>.
- Teeguarden J, Hanson-Drury S, Fisher J, Doerge D. 2013. Are Typical Human Serum BPA Concentrations Measurable and Sufficient to Be Estrogenic in the General Population? *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 62: 949-63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.001>.
- 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. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102 (1-5): 175-79. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>.
- Tinwell H, Haseman J, Lefevre P, Wallis N, Ashby J. 2002. Normal Sexual Development of Two Strains of Rat Exposed in Utero to Low Doses of Bisphenol A. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 68 (2): 339-48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.339>.
- Troisi J, Mikelson C, Richards S, Symes S, Adair D, Zullo F, et al. 2014. Placental Concentrations of Bisphenol A and Birth Weight from Births in the Southeastern U.S. *Placenta* 35 (11): 947-52. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.08.091>.
- Tsukioka T, Brock J, Graiser S, Nguyen J, Nakazawa H, Makino T. 2003. Determination of Trace Amounts of Bisphenol A in Urine by Negative-Ion Chemical-Ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 19 (1): 151-53. <https://doi.org/10.2116/analsci.19.151>.
- Tucker D, Hayes Bouknight S, Brar S, Kissling G, Fenton S. 2018. Evaluation of Prenatal Exposure to Bisphenol Analogues on Development and Long-Term Health of the Mammary Gland in Female Mice. *Environmental Health Perspectives* 126 (8): 087003. <https://doi.org/10.1289/EHP3189>.
- Ullah A, Pirzada M, Jahan S, Ullah H, Razak S, Rauf N, et al. 2019. Prenatal BPA and Its Analogs BPB, BPF, and BPS Exposure and Reproductive Axis Function in the Male Offspring of Sprague Dawley Rats. *Human & Experimental Toxicology* 38 (12): 1344-65. <https://doi.org/10.1177/0960327119862335>.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, et al. 2008. Maternal Bisphenol-A Levels at Delivery: A Looming Problem? *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 28 (4). <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211913>.

- Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Myridakis A, Chalkiadaki G, Fthenou E, Dermitzaki E, et al. 2016. Association of Early Life Exposure to Bisphenol A with Obesity and Cardiometabolic Traits in Childhood. *Environmental Research* 146: 379-87. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.017>.
- Valvi D, Casas M, Mendez M, Ballesteros-Gómez A, Luque N, Rubio S, et al. 2013. Prenatal Bisphenol a Urine Concentrations and Early Rapid Growth and Overweight Risk in the Offspring. *Epidemiology* 24 (6): 791-99. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182a67822>.
- Van Landuyt K, Nawrot T, Geebelens B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. 2011. How Much Do Resin-Based Dental Materials Release? A Meta-Analytical Approach. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials* 27 (8): 723-47. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>.
- Vandenberg L, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons W. 2007. Human Exposure to Bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24 (2): 139-77. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>.
- Vandenberg L, Chahoud I, Heindel J, Padmanabhan V, Paumgartten F, Gilbert Schoenfelder. 2010. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 118 (8): 1055-70. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>.
- Vandenberg L, Colborn T, Hayes T, Heindel J, Jacobs D, Lee DH, et al. 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 33 (3): 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>.
- Vandenberg L, Ehrlich S, Belcher S, Ben-Jonathan N, Dolinoy D, Hugo E, et al. 2013a. Low dose effects of bisphenol A. *Endocrine Disruptors* 1 (1): e26490. <https://doi.org/10.4161/endo.26490>.
- Vandenberg L, Hunt P, Peterson Myers J, Vom Saal F. 2013b. Human Exposures to Bisphenol A: Mismatches between Data and Assumptions. *Reviews on Environmental Health* 28 (1): 37-58. <https://doi.org/10.1515/reveh-2012-0034>.
- Vandenberg L, Welshons W, Vom Saal F, Toutain PL, Myers JP. 2014. Should Oral Gavage Be Abandoned in Toxicity Testing of Endocrine Disruptors? *Environmental Health: A Global Access Science Source* 13 (1): 46. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-46>.
- Vasconcelos S, Caniçais C, Chuva de Sousa Lopes S, Marques C, Dória S. 2023. The role of DNA hydroxymethylation and TET enzymes in placental development and pregnancy outcome. *Clin. Epigenetics*. 15(1):66. doi: 10.1186/s13148-023-01483-z.
- Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, Ye W, Domino S, Padmanabhan V. 2015. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (11): E1394-1403. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1724>.
- Viguié C, Chaillou E, Gayrard V, Picard-Hagen N, Fowler PA. 2020. Toward a better understanding of the effects of endocrine disrupting compounds on health: Human-relevant case studies from sheep models. *Moll. Cell. Endocrinol.* 505: 110711. doi: 10.1016/j.mce.2020.110711.
- Villar-Pazos S, Martinez-Pinna J, Castellano-Muñoz M, Alonso-Magdalena P, Marroqui L, Quesada I, et al. 2017. Molecular Mechanisms Involved in the Non-Monotonic Effect

- of Bisphenol-a on Ca²⁺ Entry in Mouse Pancreatic β -Cells. *Scientific Reports* 7 (1): 11770. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11995-3>.
- Viñas R, Watson C. 2013. Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives* 121 (3): 352-58. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205826>.
- Völkel W, Colnot T, Csanády G, Filser G, Dekant W. 2002. Metabolism and Kinetics of Bisphenol a in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology* 15 (10): 1281-87. <https://doi.org/10.1021/tx025548t>.
- 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: The Biological Fate of Chemicals* 33 (11): 1748-57. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005454>.
- Vrachnis N, Loukas N, Vrachnis D, Antonakopoulos N, Zygouris D, Kolialexi A, et al. 2021. A Systematic Review of Bisphenol A from Dietary and Non-Dietary Sources during Pregnancy and Its Possible Connection with Fetal Growth Restriction: Investigating Its Potential Effects and the Window of Fetal Vulnerability. *Nutrients* 13 (7): 2426. <https://doi.org/10.3390/nu13072426>.
- Vrooman L, Oatley J, Griswold J, Hassold T, Hunt P. 2015. Estrogenic exposure alters the spermatogonial stem cells in the developing testis, permanently reducing crossover levels in the adult. *PLoS Genet.* 11:e1004949. doi: 10.1371/journal.pgen.1004949
- Vyas A, Veiga-Lopez A, Ye W, Salloum B, Abbott D, Yang S, et al. 2019. Developmental Programming: Sex-Specific Programming of Growth upon Prenatal Bisphenol A Exposure. *Journal of Applied Toxicology* 39 (11): 1516-31. <https://doi.org/10.1002/jat.3836>.
- Waddington CH (1939) *An introduction to modern genetics* /by C. H. Waddington. George Allen & Unwin, London
- Waidyanatha S, Black S, Snyder R, Yueh Y, Sutherland V, Patel P, et al. 2018. Disposition and Metabolism of the Bisphenol Analogue, Bisphenol S, in Harlan Sprague Dawley Rats and B6C3F1/N Mice and in Vitro in Hepatocytes from Rats, Mice, and Humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 351: 32-45. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.008>.
- Wan Y, Huo W, Xu S, Zheng T, Zhang B, Li Y, et al. 2018. Relationship between Maternal Exposure to Bisphenol S and Pregnancy Duration. *Environmental Pollution* 238: 717-24. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.057>.
- Wang X, Wang X, Chen Q, Luo ZC, Zhao S, Wang W, et al. 2017. Urinary Bisphenol A Concentration and Gestational Diabetes Mellitus in Chinese Women. *Epidemiology* 28: S41-47.
- Wang G, Xu G, Zhang C, Han A, Zhang G, Chen L, et al. 2023. Gestational Bisphenol A Exposure Advances Puberty Onset in Female Offspring: Critical Time Window Identification. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 249 : 114387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114387>.
- Watkins D, Téllez-Rojo M, Ferguson K, Lee J, Solano-Gonzalez M, Blank-Goldenberg C, et al. 2014. In Utero and Peripubertal Exposure to Phthalates and BPA in Relation to Female Sexual Maturation. *Environmental Research* 134: 233-41. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.010>.

- Watson C, Bulayeva N, Wozniak A, Finnerty C. 2005. Signaling from the Membrane via Membrane Estrogen Receptor-Alpha: Estrogens, Xenoestrogens, and Phytoestrogens. *Steroids* 70 (5-7): 364-71. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.03.002>.
- Weise P, Appel P, Kolossa-Gehring M. 2022. Human Biomonitoring for Europe (HBM4EU)-first insights into the results of the initiative. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 65 (9): 936-39. <https://doi.org/10.1007/s00103-022-03578-z>.
- Wetherill Y, Akingbemi B, Kanno J, McLachlan J, Nadal A, Sonnenschein C, et al. 2007. In Vitro Molecular Mechanisms of Bisphenol A Action. *Reproductive Toxicology* 24 (2): 178-98. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.010>.
- WHO: IPCS: Environmental Health Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Geneva, WHO Press, 2009.
- Winkler J, Liu P, Phong K, Hinrichs J, Ataii N, Williams K, et al. 2022. Bisphenol A Replacement Chemicals, BPF and BPS, Induce Protumorigenic Changes in Human Mammary Gland Organoid Morphology and Proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (11): e2115308119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115308119>.
- Wolff M, Pajak A, Pinney S, Windham G, Galvez M, Rybak M, et al. 2017. Associations of Urinary Phthalate and Phenol Biomarkers with Menarche in a Multiethnic Cohort of Young Girls. *Reproductive Toxicology* 67: 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.009>.
- Woods M, Lanphear B, Braun J, McCandless L. 2017. Gestational Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals in Relation to Infant Birth Weight: A Bayesian Analysis of the HOME Study. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 16 (1): 115. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0332-3>.
- Wu H, Zhang Y. 2011. Mechanisms and Functions of Tet Protein-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation. *Genes & Development* 25 (23): 2436-52. <https://doi.org/10.1101/gad.179184.111>.
- Wu X, Zhang Y. 2017. TET-Mediated Active DNA Demethylation: Mechanism, Function and Beyond. *Nature Reviews. Genetics* 18 (9): 517-34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
- Wu LH, Zhang XM, Wang F, Gao CJ, Chen D, Palumbo J, et al. 2018. Occurrence of Bisphenol S in the Environment and Implications for Human Exposure: A Short Review. *The Science of the Total Environment* 615: 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.194>.
- Xu X, Chiung YM, Lu F, Qiu S, Ji M, Huo X. 2015. Associations of Cadmium, Bisphenol A and Polychlorinated Biphenyl Co-Exposure in Utero with Placental Gene Expression and Neonatal Outcomes. *Reproductive Toxicology* 52: 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.02.004>.
- Yamada H, Furuta I, Kato E, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, et al. 2002. Maternal Serum and Amniotic Fluid Bisphenol A Concentrations in the Early Second Trimester. *Reproductive Toxicology* 16 (6): 735-39. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00051-5](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00051-5).

- Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, Yakabe Y. 2004. Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and Their Receptor-Binding Affinity. *Toxicology Letters* 146 (2): 111-20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.07.003>.
- Yang F, Chen LQ, Jin MF, Zhou W, Wu HY. 2014. Impact of neonatal exposure to different doses of bisphenol A on puberty in female rats. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics* 16 (7): 754-58.
- Yao Q, Chen Y, Zhou X. 2019. The Roles of MicroRNAs in Epigenetic Regulation. *Current Opinion in Chemical Biology* 51: 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.024>.
- Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. 2008. Genome-Wide Analysis of Epigenomic Alterations in Fetal Mouse Forebrain after Exposure to Low Doses of Bisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376 (3): 563-67. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.028>.
- Ye Y, Tang Y, Xiong Y, Feng L, Li X. 2019. Bisphenol A Exposure Alters Placentation and Causes Preeclampsia-like Features in Pregnant Mice Involved in Reprogramming of DNA Methylation of WNT2. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (2): 2732-42. <https://doi.org/10.1096/fj.201800934RRR>.
- Yu B, Chen QF, Liu ZP, Xu HF, Zhang XP, Xiang Q, et al. 2010. Estrogen Receptor α and β Expressions in Hypothalamus-Pituitary-Ovary Axis in Rats Exposed Lactationally to Soy Isoflavones and Bisphenol A. *Biomedical and Environmental Sciences: BES* 23 (5): 357-62. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60076-1](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60076-1).
- Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. 2011. Viable Skin Efficiently Absorbs and Metabolizes Bisphenol A. *Chemosphere* 82 (3): 424-30. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.058>.
- Zbucka-Krętuńska M, Łazarek U, Miltik W, Sidorkiewicz I, Pierzyński P, Milewski R, et al. 2019. Simultaneous Analysis of Bisphenol A Fractions in Maternal and Fetal Compartments in Early Second Trimester of Pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine* 47 (7): 765-70. <https://doi.org/10.1515/jpm-2019-0040>.
- Zhang B, He Y, Zhu H, Huang X, Bai X, Kannan K, et al. 2020. Concentrations of Bisphenol A and Its Alternatives in Paired Maternal-Fetal Urine, Serum and Amniotic Fluid from an e-Waste Dismantling Area in China. *Environment International* 136: 105407. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105407>.
- Zhang L, Lu Q, Chang C. 2020. Epigenetics in Health and Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1253: 3-55. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1.
- Zhang YF, Ren XM, Li YY, Yao XF, Li CH, Qin ZF, et al. 2018. Bisphenol A Alternatives Bisphenol S and Bisphenol F Interfere with Thyroid Hormone Signaling Pathway in Vitro and in Vivo. *Environmental Pollution* 237: 1072-79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.027>.
- Zhang N, Zhao Y, Zhai L, Bai Y, Jia L. 2023. Urinary bisphenol A and S are associated with diminished ovarian reserve in women from an infertility clinic in Northern China. *Ecotoxicol Environ Saf.* 256:114867. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114867.
- Zhao Z, Fan L, Frick K. 2010. Epigenetic Alterations Regulate Estradiol- Induced Enhancement of Memory Consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (12): 5605-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910578107>

- Zhao Z, Fan L, Fortress A, Boulware M, Frick K. 2012. Hippocampal Histone Acetylation Regulates Object Recognition and the Estradiol-Induced Enhancement of Object Recognition. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (7): 2344-51. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5819-11.2012>.
- Zhou R, Chen F, Chang F, Bay Y, Chen L. 2013. Persistent Overexpression of DNA Methyltransferase 1 Attenuating GABAergic Inhibition in Basolateral Amygdala Accounts for Anxiety in Rat Offspring Exposed Perinatally to Low-Dose Bisphenol A. *Journal of Psychiatric Research* 47 (10): 1535-44. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.05.013>.
- Zhou B, Yang P, Deng YL, Zeng Q, Lu WQ, Mei SR. 2020. Prenatal Exposure to Bisphenol a and Its Analogues (Bisphenol F and S) and Ultrasound Parameters of Fetal Growth. *Chemosphere* 246: 125805. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125805>.
- Zoeller T, Bansal R, Parris C. 2005. Bisphenol-A, an Environmental Contaminant That Acts as a Thyroid Hormone Receptor Antagonist in Vitro, Increases Serum Thyroxine, and Alters RC3/Neurogranin Expression in the Developing Rat Brain. *Endocrinology* 146 (2): 607-12. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1018>.
- Zoeller R, Brown T, Doan L, Gore A, Skakkebaek N, Soto A, et al. 2012. Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153 (9): 4097-4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>.

Annexes



CHAPTER ONE

Endocrine-Disrupting Chemicals and Human Growth and Maturation: A Focus on Early Critical Windows of Exposure

Julie Fudvoye, Jean-Pierre Bourguignon, Anne-Simone Parent¹

Developmental Neuroendocrinology Unit, GIGA Neurosciences, University of Liège, CHU, Liège, Belgium
¹Corresponding author: e-mail address: asparent@ulg.ac.be

Contents

1. Introduction	2
2. Challenges in Evidencing Endocrine Disruption	2
3. Endocrine-Disrupting Chemicals and Fetal Growth	4
4. EDCs and Sexual Differentiation	5
5. EDCs and Puberty	8
6. EDCs and Brain Development	9
6.1 Disruption of thyroid function and brain development	11
6.2 Disruption of sex steroid action and brain development	12
7. EDC and Energy Balance	14
8. Epigenetic Perspective on the Developmental Effects of EDCs	16
9. Conclusion	17
References	18

Abstract

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are exogenous substances that interfere with hormone synthesis, metabolism, or action. In addition, some of them could cause epigenetic alterations of DNA that can be transmitted to the following generations. Because the developing organism is highly dependent on sex steroids and thyroid hormones for its maturation, the fetus and the child are very sensitive to any alteration of their hormonal environment. An additional concern about that early period of life comes from the shaping of the homeostatic mechanisms that takes place also at that time with involvement of epigenetic mechanisms along with the concept of fetal origin of health and disease. In this chapter, we will review the studies reporting effects of EDCs on human development. Using a translational approach, we will review animal studies that can shed light on some mechanisms of action of EDCs on the developing organism. We will focus on the major hormone-dependent stages of development: fetal growth, sexual differentiation, puberty, brain development, and energy balance. We will also discuss the possible epigenetic effects of EDCs on human development.



1. INTRODUCTION

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are exogenous substances that interfere with hormone synthesis, metabolism, or action. Moreover, it appears that some of them could cause epigenetic alterations of the DNA that can be transmitted to the following generations. Animal and human studies have brought evidence that EDCs affect male and female reproduction, thyroid function, and control of energy balance. They could increase the risk of breast or prostate cancer as well as the risk of metabolic syndrome (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Because the developing organism is highly dependent on sex steroids and thyroid hormones for its maturation, the fetus and the child are very sensitive to any alteration of their hormonal environment. An additional concern about that early period of life comes from the shaping of the homeostatic mechanisms that takes place also at that time with involvement of epigenetic mechanisms along with the concept of fetal origin of health and disease (Gluckman, Hanson, & Low, 2011). Most studies have identified the perinatal period as a specific window of sensitivity. However, most of the reported effects were observed later in life. A review of the existing literature underlines the need for identification of early markers of exposure to EDCs. In this chapter, we will review the studies reporting effects of EDCs on human development. Using a translational approach, we will review animal studies that can shed light on some mechanisms of action of EDCs on the developing organism. We will focus on the major hormone-dependent stages of development: fetal growth, sexual differentiation, puberty, brain development, and energy balance. We will also discuss the possible epigenetic effects of EDCs on human development.



2. CHALLENGES IN EVIDENCING ENDOCRINE DISRUPTION

Before we discuss the different aspects of growth and maturation that are possibly altered by endocrine disruption, it is important to be aware of some challenges (Table 1.1) that we face in this area and that are relevant to all the specific aspects we will discuss later. Because the persistence of EDCs in the body and the environment is highly variable between few days such as for bisphenol A (BPA) (Rudel et al., 2011) and several decades such as for

Table 1.1 Challenges in the demonstration of endocrine disruption

1. Variable persistence in the body and the environment
2. Variable effects depending on the critical periods and duration of exposure
3. Simultaneous action at different interrelated levels of endocrine systems
4. Low-dose mixtures consistent with human exposure not conforming to simple additive models
5. Nonmonotonic dose–response relationship
6. Variable latency between exposure and effects including multigenerational impact

1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDE) (Kirman, Aylward, Hays, Krishnan, & Nong, 2011), linking any disorder with previous EDC exposure is most difficult especially when latency is long between exposure and manifestation of health consequences. Also, the effects of EDCs can vary depending on the critical periods and duration of exposure. As will be discussed in the next sections, prenatal and early postnatal life is a period characterized by organization of the mechanisms that will drive homeostatic processes such as control of reproduction and energy balance. Obviously, EDC interference during those organizing periods could have much more severe consequences than later in life. Among the features of endocrine systems, they involve a cascade of activation or inhibition at different levels where EDCs play disturbing roles. We will see illustrations with puberty and reproduction that can be altered by effects at the hypothalamic–pituitary level as well as in target tissues (e.g., breasts). This also applies to energy balance through involvement of hypothalamic centers as well as fat tissue. Moreover, the physiological feedback systems through factors such as sex steroids and leptin, respectively, will also be disturbed by EDCs. Further challenges come from observations that are inconsistent with classical toxicology: Low-dose mixtures that are consistent with human exposure can have effects not conforming to simple additive models (Christiansen et al., 2012; Kortenkamp, 2008); the dose–response relationship can be nonmonotonic such as seen for BPA with U-shaped dose–response curves (Vandenberg et al., 2012). For both reasons, setting a threshold dose for EDC effects has become meaningless. A final issue is the highly variable latency between exposure and effects including multigenerational impact.



3. ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS AND FETAL GROWTH

Data concerning EDCs effects on fetal growth are scarce. However, one can hypothesize that fetal growth could be altered by endocrine disruption. Indeed, several EDCs cross the placental barrier and accumulate in the embryo or amniotic fluid (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). The fetus is particularly sensitive to the effects of EDCs because of its dependency on hormones for development (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Moreover, animal studies have shown that most biotransformation enzymes are not produced until after birth (Pottenger et al., 2000), which means that fetuses might be exposed longer to higher concentration of EDCs. Clearance of BPA from fetal circulation, for instance, is slower than from maternal circulation (Takahashi & Oishi, 2000). It remains very complex to evaluate the effects of prenatal exposure to EDCs on fetal growth in human. Most studies focus on correlations between birth weight and serum or urinary levels of EDCs during pregnancy or at birth. Because of some limitations discussed later, few studies have identified a link between prenatal exposure to EDCs and fetal growth. We will review here some of the most significant human data as well as supporting animal studies.

For BPA, for instance, few studies have been published and lead to various results. Miao et al. have shown that maternal exposure to BPA in the workplace was associated with decreased birth weight (Miao et al., 2011b) after adjusting for confounding factors. BPA exposure during pregnancy was evaluated through personal air-sampling measurements and exposure history. Chou et al. (2011) reported an increased risk of low birth weight in male newborn exposed prenatally to higher levels of BPA, while Padmanabhan did not report any effect of BPA neither on birth weight nor on length (Padmanabhan et al., 2008). In both studies, prenatal exposure to BPA was evaluated through a single measurement of BPA in maternal or cord blood. Philippat et al. have shown an association between urinary BPA concentration (in one urinary sample between 24 and 30 weeks of gestation) and birth weight following an inverse U shape (Philippat et al., 2012). However, serial urinary measurements before and during pregnancy have been shown to be highly variable and this variability was even increased during pregnancy (Braun et al., 2011a). Given this variability, it appears that more than one sample may be necessary to adequately classify gestational exposure to BPA especially because the half-life is short and the clearance rate is rather

rapid as opposed to other EDCs. Rudel et al. (2011) showed that urinary excretion of BPA fell significantly 2–3 days after changing habits regarding food, drinks, and containers. In addition, for feasibility reasons, most studies focus on one or a few compounds and might miss exposure to other EDCs. Another limitation of current epidemiological studies is the studied parameters: most studies focus on birth weight, while they might oversee more subtle effects of EDCs on body composition.

Some epidemiological studies have identified a negative correlation between exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and birth weight. PBDEs are flame-retardant chemicals used in the manufacture of infant products, furniture, and electronics. Ninety-seven percent of the American population appears to be contaminated by those persistent EDCs (Sjödén et al., 2008). Animal studies have shown that PBDEs disrupt thyroid function and alter behavior and memory (Herbstman et al., 2010). A prospective study in a population of 286 pregnant women with low income living in California showed that higher concentrations of PBDEs in maternal serum during pregnancy were associated with lower birth weight. Each 10-fold increase in concentrations of BDE-47, BDE-99, and BDE-100 was associated with a 115 g decrease in birth weight (Harley et al., 2011). Other smaller studies had similarly shown that higher concentrations of PBDEs were associated with a higher risk of delivering lower birth weight infants (Chao, Wang, Lee, Wang, & Pöpke, 2007; Wu et al., 2010). Some human studies, however, did not identify any effects of PBDE exposure on birth weight (Mazdai, Dodder, Abernathy, Hites, & Bigsby, 2003; Tan, Loganath, Chong, & Obbard, 2009). Animal models have not reported an effect of PBDEs on birth weight but identified a decreased weight gain of offspring during the postnatal period, which is comparable to the third trimester of pregnancy in human (Kodavanti et al., 2010). The tested doses were however elevated and difficult to translate into relevant environmental exposure.



4. EDCs AND SEXUAL DIFFERENTIATION

Sexual differentiation depends on prenatal hormonal environment. Therefore, exposure to EDCs may be associated with disorders of development of the reproductive system by altering this hormonal environment. Cryptorchidism and hypospadias in the male newborn and low sperm counts and increased risk of testicular germ cell cancer in young adult males belong to a lifelong spectrum of disorders caused by early impairment of testicular

function. This association of disorders has been proposed as the testicular dysgenesis syndrome (TDS) (Skakkebaek, Rajpert-De Meyts, & Main, 2001). TDS appears to involve deficient testosterone (androgen) production by the fetal testis (Sharpe & Skakkebaek, 2008). Indeed, it has been shown that normal development of the male reproductive system depends on the crucial role of androgen within an early fetal time window, called the masculinization programming window (Welsh et al., 2008), which influences the reproductive capacity throughout life. Thus, EDCs, which interfere with the synthesis or action of androgens, can have deleterious consequences for the developing male genital tract and appear to be risk factors for TDS (Bay, Asklund, Skakkebaek, & Andersson, 2006).

Several animal experimental studies have confirmed this hypothesis, especially using the phthalates, a group of anti-androgenic compound present in personal care products, coating of pharmaceutical products, and soft plastics. Male offspring of pregnant rats exposed to 250 mg/kg or more of monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate, on days 15–17 of pregnancy had an increased incidence of undescended testes and a decreased anogenital distance, a marker of androgenic impregnation (Ema, Miyawaki, Hirose, & Kamata, 2003). Likewise, Fisher et al. reported a TDS-like condition after fetal rat exposure to phthalate esters (Fisher, Macpherson, Marchetti, & Sharpe, 2003). The effects of phthalates on male sexual development in rats result from alterations of Leydig cell function leading to androgen insufficiency, which can be responsible of hypospadias or cryptorchidism. Swan et al., in 2005, have demonstrated a similarly reduced androgenization after phthalate exposure in humans since boys whose mother had elevated prenatal phthalate exposure, measured through phthalate urinary concentration, had shorter anogenital distance and impaired testicular descent (Swan et al., 2005). Main et al. (2006) reported that free testosterone levels at age 1–3 months were negatively correlated with monoethyl phthalate (MEP) levels in breast milk collected during that period. A reduced Leydig cell response to LH was suggested by the increasing LH/free testosterone ratio in relation to milk MEP levels (Main et al., 2006). Though these findings suggest similar mechanisms in both rodents and humans, recent studies indicate possible differences in testicular sensitivity to phthalate effects among humans and rodents. Given the difficulty to evaluate the production of testosterone by the human fetal testis, Mitchell et al. (2012) and Heger et al. (2012) used a xenograft model to evaluate the effects of phthalates on steroidogenesis of human fetal testis. They used second-trimester human fetal testes xenografts, which were exposed to

phthalates for 1–4 days or 21 days. There was no difference in serum testosterone levels or in the seminal vesicles weight between xenograft model exposed to DBP or MBP and controls (Mitchell et al., 2012). Heger et al. (2012) reported that steroidogenesis was suppressed in rodent xenograft but not in human xenografts in such conditions. Germ cell alterations however were observed in human xenografts.

Data concerning BPA are controversial. In animal studies, perinatal BPA exposure has been shown to lead to decreased levels of testicular testosterone (Richter et al., 2007) or impaired fertility (Salian, Doshi, & Vanage, 2009). These data are consistent with two human epidemiological studies highlighting the negative effect of BPA on the male reproductive function, by modifying sex hormone concentrations (Galloway et al., 2010; Meeker, Calafat, & Hauser, 2010). However, other animal and human studies have reported conflicting results when studying effect of BPA on male reproductive tract. Indeed, in human, an association between maternal exposure to BPA during pregnancy and a shorter anogenital distance in male offspring has been shown (LaRocca, Boyajian, Brown, Smith, & Hixon, 2011), while cord blood BPA levels are not different between normal and cryptorchid boys (Ema et al., 2001). In rodents, several studies have reported that BPA exposure *in utero* had no effect on the adult male reproductive system (Fénichel et al., 2012; Kobayashi, Ohtani, Kubota, & Miyagawa, 2010; Meeker et al., 2010; Miao et al., 2011a).

Interestingly, one recent study has evaluated the effects of perinatal exposure to BPA and diethylhexyl phthalate on gonadal development of male mice. Using a mixture of EDCs (DEHP and BPA) better illustrates the synergistic effects of a combination of EDCs as encountered in the environment (Xi et al., 2012). Significant reduction in testicular weight and/or epididymal sperm count was identified in immature and mature animals on postnatal days 15 and 42. Serum testosterone levels were also decreased. These authors however used doses of EDCs that were higher than those relevant for human exposure and mixture effects.

We discussed earlier the peripheral effects of EDCs on sexual differentiation. However, brain sexual differentiation should not be ignored because of its sensitivity to hormonal environment and its significance for reproduction. It is well established that testosterone secreted by the fetal and neonatal testis is involved in brain sexual differentiation, most likely after it has been converted to estradiol by aromatase in specific brain regions during critical periods of development (Rubin et al., 2006). Thus, perinatal exposure to BPA could alter sex steroid action in the rodent brain and

disrupt the development of sexually dimorphic pathways. This concept is confirmed by data available in animals. Kubo et al. demonstrated that BPA exposure during prenatal and postnatal period abolished the sex differences in open-field behavior in mice. Likewise, it increases the size of the locus coeruleus (LC) in males and decreases LC volume in females (Kubo et al., 2003). Rubin et al. also identified an effect of BPA on brain sexual differentiation since exposure to low doses of BPA decreased the sexually dimorphic population of tyrosine hydroxylase (TH) neurons in the rostral periventricular preoptic area, an important brain region for estrous cyclicity and estrogen-positive feedback (Rubin et al., 2006). Similarly, a decreased sexual dimorphism in the number of corticotropin-releasing hormone neurons in the bed nucleus of the stria terminalis has been shown after BPA exposure, whereas there was no effect in the preoptic area (Funabashi, Kawaguchi, Furuta, Fukushima, & Kimura, 2004). Moreover, Tando et al. have shown that BPA exposure can affect brain development in a sex-specific manner. Indeed, a significant reduction in the total volume and density of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) is observed only in adult female offspring after maternal BPA treatment during pregnancy and lactation (Tando et al., 2007). The cited studies underline the need to focus on both sexes when studying EDCs in order to identify sexual dimorphism in sensitivity to endocrine disruption.



5. EDCs AND PUBERTY

The effects of EDCs on puberty have been investigated mainly through variations in pubertal timing with emphasis on the onset of sexual maturation. Therefore, our current knowledge may miss some additional effects such as changes in age at occurrence of regular (ovulatory) cycles. As stated earlier, the appraisal of EDC effects on puberty is complex due to involvement of possible effects on peripheral target organs such as uterus and breast in females and penis in males as well as effects on neuroendocrine control of maturation through hypothalamic–pituitary maturation. Second, pubertal timing can be influenced by exposure close to the time of puberty or during the process of puberty as well as much earlier in life since pubertal timing is one among the parameters programmed during fetal/neonatal life. The published human observations after exposure that was estimated to have occurred pre- or neonatally are summarized in Table 1.2 and those after postnatal exposure in Table 1.3. The data are scarce and it appears that

Table 1.2 Effect of prenatal or early postnatal exposure to EDCs on timing of breast development and menarche

Pubertal timing	Early		Normal		Delayed	
	Breast	Menarche	Breast	Menarche	Breast	Menarche
DDE (+DDT)	Krstevska-Konstantinova et al. (2001)	Vasiliu, Muttineni, and Karmaus (2004)				
PCBs				Vasiliu et al. (2004), Yang et al. (2005)		
Dioxins				Leijs et al. (2008), Warner et al. (2004)	Leijs et al. (2008)	
Mixture of pesticides	Wohlfahrt-Veje et al. (2012)					

no firm conclusion can be drawn. It is of note that, except in conditions of accidental massive exposure to a single class of EDCs, mixtures are likely involved in most conditions. Therefore, measurement of particular compounds and study of a compound in relation to pubertal timing may involve some biases.



6. EDCs AND BRAIN DEVELOPMENT

Several studies have reported that prenatal or early postnatal exposure to some EDCs is associated with alterations of cognitive or motor functions in children. Knowing the fundamental role played by thyroid hormones and sex steroids in cortex development, one can hypothesize that disruption of those hormones could cause alteration of the development of the cerebral cortex and of its functions later in life. We will review here the human data suggesting a causal effect for endocrine disrupters on impairment of cortical functions and approach some EDC mechanisms of action using animal models.

Table 1.3 Effect of postnatal exposure to EDCs on timing of breast development and menarche

Pubertal timing	Early		Normal		Delayed	
	Breast	Menarche	Breast	Menarche	Breast	Menarche
DDE(+DDT)		Ouyang et al. (2005)	Wolff et al. (2008)	Denham et al. (2005)		
PCBs	Denham et al. (2005)	Denham et al. (2005)	Den Hond et al. (2002), Wolff et al. (2008)	Den Hond et al. (2002)		
Dioxins				Den Hond et al. (2002)	Den Hond et al. (2002)	
Phthalates	Colon et al. (2000), Wolff et al. (2010)		Lomenick et al. (2010), Frederiksen et al. (2012)			Pubarche: Frederiksen et al. (2012)
Soy phytoestrogens			Strom et al. (2001)	Strom et al. (2001)	Wolff et al. (2008, 2010)	

6.1. Disruption of thyroid function and brain development

Thyroid hormones are known to be essential for brain development. They regulate progenitor proliferation and differentiation, neuron migration, and dendrite outgrowth (Parent, Naveau, Gerard, Bourguignon, & Westbrook, 2011). Even mild thyroid hormone insufficiency in humans can produce measurable deficits in cognitive functions (Zoeller & Rovet, 2004). Thyroid hormone action is mediated by two classes of nuclear receptors (Forrest & Vennström, 2000) that exhibit differential spatial and temporal expressions in the brain, suggesting that thyroid hormones have variable functions during brain development (Horn & Heuer, 2010). This differential expression of thyroid hormone receptors explains the critical period of thyroid hormone action on brain development as suggested by models of maternal hypothyroidism or congenital hypothyroidism (Zoeller & Rovet, 2004). Depending on the timing of onset of hypothyroidism, the offspring will display problems of visual attention, gross or fine motor skills, or language and memory skills. Similarly, one can hypothesize that disruption of thyroid function by EDCs will have different effects based on the timing of exposure. However, few studies focused on that aspect.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) form a group of widespread environmental contaminants composed of 209 different congeners used in a wide variety of applications. Their production was banned in the 1970s but PCBs are still present in the environment due to their high stability. PCBs were among the first EDCs identified as responsible for alterations of cognitive functions. Indeed, impaired memory and altered learning abilities have been associated with prenatal exposure to EDCs in humans and rodents (Schantz, Widholm, & Rice, 2003). In animal models, perinatal exposure to PCBs has been consistently associated with a decrease of thyroid hormone concentration in maternal serum as well as pup serum (Brouwer et al., 1998). Some but not all epidemiological studies in human have found an association between PCB body burden and thyroid hormone levels (Langer, 2008). This disruption of thyroid function could explain some of the effects of PCBs on the developing brain. Indeed, animal models have shown that the ototoxic effects of PCBs could be partially ameliorated by thyroxin replacement and PCBs seem to alter some of the developmental processes in the cortex and the cerebellum that are dependent on thyroid hormones (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). However, recent publications raise important issues. First, PCBs produce paradoxical effects on the thyroid system; PCBs reduce serum T₄ but increase the expression of some genes regulated by TH (Zoeller, Dowling, & Vas, 2000). Second, while some report agonistic

actions of PCBs on the TH receptor (Gauger et al., 2007), others report antagonistic actions (Koibuchi & Iwasaki, 2006). Although this appears paradoxical, it is consistent with *in vivo* studies showing that PCBs can exert different actions on TH response genes in the developing brain (Bansal & Zoeller, 2008). In addition, as suggested by *in vitro* models, some congeners can have direct toxic effects on neurons through alterations of neurotransmission or intracellular signaling, independent of disruption of thyroid hormones.

PBDEs are semivolatile and migrate into house dust, placing the young children at risk of higher exposure (Stapleton et al., 2008). Animal studies suggest that pre- and postnatal exposure to different PBDE congeners causes long-lasting behavioral alterations, in particular alterations of motor activity and cognitive behavior (reviewed in Costa & Giordano, 2007). As it is the case for other EDCs, some windows of susceptibility have been identified during pre- and postnatal brain development (Eriksson, Viberg, Jakobsson, Orn, & Fredriksson, 2002; Kuriyama & Chahoud, 2004). Recent studies have shown that exposure to PBDEs causes alteration of thyroid hormone levels in pregnant women (Chevrier et al., 2010) and infants (Herbstman et al., 2008) as it is the case in rodents. Only very few studies, however, have focused on the molecular or cellular effects of perinatal exposure to PBDEs *in vivo*. Viberg et al. have reported a decrease of cholinergic nicotinic receptors in the hippocampus after exposure to BDE-99 and BDE-153 (Viberg, Fredriksson, & Eriksson, 2003). However, the link between such a decrease and the behavioral effects of PBDEs is still unclear. Other teams have reported that exposure to PBDEs reduced hippocampal long-term potentiation and decreased brain-derived neurotrophic factor expression in the brain (Viberg, Mundy, & Eriksson, 2008). While several studies have reported negative effect of PBDEs on brain development and cognitive function in animals, there is relatively little information about adverse health effects of PBDEs in humans. Some very recent studies have identified a correlation between prenatal exposure to PBDEs and alteration of cognitive functions. Eskenazi et al. have reported that both prenatal and early postnatal PBDE exposures were associated with poorer attention and fine motor coordination and cognition in a cohort of 300 school-age children at 5 and 7 years of age (Eskenazi et al., 2012).

6.2. Disruption of sex steroid action and brain development

Sex steroids also play a major role during brain development. Androgens and estrogens sculpt the gender-specific differences of brain regions involved in

behavior, learning, memory, mood, and socialization. Both androgens and estrogens stimulate progenitor proliferation in the cortex and hippocampus. However, it has been shown in the hippocampus that androgens preferably support neurogenesis, whereas estrogens promote gliogenesis (Zhang, Konkle, Zup, & McCarthy, 2008). Estrogens and aromatizable androgens also regulate dendritic outgrowth, synaptic function, and neuronal connectivity. Because several EDCs affect estrogen and androgen receptors directly or indirectly through an effect on sex steroid biosynthesis, it is important to examine the effects of those EDCs on development of the cerebral cortex, the hippocampus, and the hypothalamus. As an illustration, we will summarize here some of the effects of BPA on behavior and cognitive functions in animals and humans. As developed earlier in this chapter, BPA has been shown to alter sexually dimorphic behaviors such as aggression, anxiety, and exploration in rodents (Palanza, Gioiosa, vom Saal, & Parmigiani, 2008; vom Saal et al., 2007). Sexually dimorphic disorders such as autism, attention deficit, or hyperactivity could be correlates of these animal behaviors and might be related to early exposure to EDCs. Braun et al. (2011a) studied a prospective cohort of 244 mothers and their 3-year-old children. BPA exposure was evaluated by measuring BPA levels in maternal urine at 16 and 26 weeks of gestation as well as BPA urinary levels in the children at 1, 2, and 3 years of age. Each 10-fold increase in gestational BPA exposure was associated with more anxious and depressed behavior and poorer emotional control in the 3-year-old children (Braun et al., 2011b). Effects appeared to be sexually different since girls, for example, exhibited increased hyperactivity, while boys exhibited decreased hyperactivity after gestational exposure to BPA. It is not known however if those effects will persist later in life. Those results illustrate the importance of the window of exposure since behavior appeared to be affected by prenatal exposure to BPA but not by postnatal exposure.

One can hypothesize that perinatal exposure to EDCs could lead to alterations of the development of brain circuits and an increased risk of neurodevelopmental deficits. Indeed, the developing brain is remarkably malleable. Such plasticity is advantageous in that it allows the refinement of the basic organization in response to the surrounding environment. However, this plasticity also can be maladaptive in that these critical developmental periods are extremely vulnerable to disruption as illustrated by neurodevelopmental disorders such as autism or fetal alcohol syndrome. Such diseases often are characterized by a disruption of functional brain circuits in the setting of grossly normal brain morphology. Animal models

could be used to identify cellular or molecular markers of EDCs effects. Indeed, the synapse is the fundamental unit responsible for formation of brain circuitry and thus should serve as a sensitive indicator of disruption by EDCs. Leranath et al. have shown that adult exposure to BPA prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex in ovariectomized nonhuman primates (Leranath et al., 2008a) and antagonizes spine formation induced by estrogens and testosterone in limbic areas in gonadectomized female and male rats (Leranath et al., 2008b; MacLusky et al., 2005). Those data were obtained after BPA exposure during adult life. A more recent study, however, showed that gestational exposure to BPA reduced the number of dopamine neurons in the midbrain and the number of spine synapses in the hippocampus, while no effects were observed when the animals were exposed during the juvenile period (Elsworth et al., 2013).



7. EDC AND ENERGY BALANCE

The concept of developmental or fetal origin of adult disease was developed by Barker at the end of the 1980s. He showed that nutritional status during early life is linked to an increased risk of cardiovascular disease in early-adult life and premature death as a consequence (Barker & Osmond, 1986; Barker, 2004). Several studies initially focused on the correlation between fetal growth (often assessed by the birth weight) and the predisposition to adult disease, in particular metabolic disorders. Thereby, it has been shown that low birth weight is correlated with a major risk to develop insulin resistance (Hales et al., 1991), metabolic syndrome (Barker et al., 1993), and obesity (Ravelli, Van Der Meulen, Osmond, Barker, & Bleker, 1999) during adulthood.

The possible implication of EDCs during pregnancy in the development of diseases in adulthood was first evoked in the early 1970s, after millions of pregnant women were prescribed DES (diethylstilbestrol). Indeed, daughters of woman treated by DES, a pharmaceutical estrogen given to prevent miscarriages, had an increased incidence of vaginal adenocarcinoma and benign reproductive lesions (Herbst, Ulfelder, & Poskanzer, 1971).

All these data highlight intrauterine and early postnatal life as critical periods for future health. According to this idea, one can hypothesize that the significant increase of obesity and metabolic syndrome incidence might be linked to perinatal disrupting factors acting as predisposition factors. Exposure to EDCs perinatally, by altering hormonal environment, could be associated with disorders of energy balance throughout subsequent life.

This hypothesis has been evocated in several animal studies. Significant data have been obtained for DES and BPA. Howdeshell et al. showed that pregnant mice fed with BPA (2.4 µg/kg/day on 11–17 days of gestation) had heavier pups than control mice (Howdeshell, Hotchkiss, Thayer, Vandenberg, & vom Saal, 1999). This finding was confirmed in 2001, by Rubin, who exposed pregnant rat to BPA (0.1 mg BPA/kg/day or 1.2 mg BPA/kg/day) and observed an increase in body weight of the male and female offspring, an increase that was more persistent in females than males (Rubin et al., 2001). BPA has also been shown to reduce glucose tolerance and increase insulin resistance in male offspring at 6 months of age (Alonso-Magdalena et al., 2010). Interestingly, some studies suggest that these changes in glucose regulation are persistent in adult offspring and are worsened if the offspring is fed with a high-fat diet (Wei et al., 2011). The data of Ryan et al., however, are not consistent with this findings since they have shown that BPA exposure during pregnancy (0.25 µg/kg/day) results in accelerated growth early in life but does not result in impaired glucose regulation in adulthood, even when the mice are maintained on a high-fat diet (Ryan et al., 2010).

In addition to altering glucose tolerance, BPA appears to affect adipogenesis very early in life. Female pups born from dams exposed to 1 mg/L of BPA in drinking water during gestation and lactation showed adipocyte hypertrophy and overexpression of lipogenic genes such PPAR-γ, SREBP-1C, SCD-1, and C/EBP-ALPHA (Somm et al., 2009). Masuno et al., using 3T3-L1 cells, a preadipocyte cell line that differentiates into mature adipocytes, have shown that BPA leads to an accelerated differentiation into adipocytes, causing high accumulation of triglycerides and lipoprotein lipase (Masuno, Iwanami, Kidani, Sakayama, & Honda, 2005; Wang, Sun, Hou, Pan, & Li, 2012). More recently, the effect of BPA on adipogenesis has been confirmed by Sargis et al., who assessed the ability of BPA (100 nM) to activate the glucocorticoid receptor and thereby increase lipid accumulation and expression of adipocytic proteins in mature adipocytes (Sargis, Johnson, Choudhury, & Brady, 2010).

In addition, exposure to BPA, at 10 nM, 1 µM, and 80 µM, increased the mRNA expression and enzymatic activity of 11β-HSD1, an enzyme that converts the inactive hormone cortisone to the active hormone cortisol in adipose tissues and promotes adipogenesis (Masuno et al., 2002). Interestingly, BPA at low doses (1 and 10 nM) also decreases adiponectin production from human adipose tissue (Hugo et al., 2008). Adiponectin is an adipocyte-specific hormone that increases insulin sensitivity and reduces

tissue inflammation (Whitehead, Richards, Hickman, Macdonald, & Prins, 2006). Similarly, it has been shown that release of IL-6 and TNF alpha, two inflammatory cytokines involved to obesity, is stimulated by BPA exposure (Ben-Jonathan, Hugo, & Brandebourg, 2009).

Effects of BPA on energy balance are also suggested by studies in humans. A large cross-sectional study in human, by Lang et al., has shown that higher urinary BPA concentrations in adults were associated with diagnosis of cardiovascular disease and diabetes and abnormal concentrations of three liver enzymes (gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase, and lactate dehydrogenase) (Lang et al., 2008; Vom Saal & Myers, 2008). However, measurements of BPA were made in adults and do not bring any information about the critical perinatal period identified in animals. A recent study in children showed that incidence of obesity was increased among children who had higher urinary BPA concentrations (Trasande, Attina, & Blustein, 2012). However, it is difficult to correlate BPA exposure and BPA urinary excretion. Moreover, the causal link remains difficult to establish. Indeed, obese children could, for instance, consume more BPA-contaminated food such as canned sodas, which would explain their higher urinary BPA levels. Further longitudinal studies are thus necessary in humans in order to determine if gestational and postnatal exposure to BPA could lead to an increased risk of metabolic syndrome later in life.



8. EPIGENETIC PERSPECTIVE ON THE DEVELOPMENTAL EFFECTS OF EDCs

Epigenetics refers to heritable alterations that are not due to changes in DNA sequence. Rather, epigenetic modifications, such as DNA methylation and histone modification, alter DNA accessibility and chromatin structure, thereby regulating patterns of gene expression. This mechanism appears as an adaptive response to insults during the developmental period, such as variations in maternal diet or sex steroids (Fowden & Forhead, 2009; Lillycrop et al., 2007). For example, it has been recently proposed that maternal undernutrition could cause epigenetic changes in the pro-opiomelanocortin (POMC) and glucocorticoid receptor genes in the fetal hypothalamus (Stevens, Begum, & White, 2011). POMC-derived peptides synthesized in neurons of the hypothalamus play a central role in the control of energy homeostasis (Coll, Sadaf, Challis, Yeo, & O'Rahilly, 2004).

EDCs, by interfering with the nutritional and/or hormonal environment during fetal life, may interfere with epigenetic programming, which can be passed from one cell generation to another and persist in adulthood (McClachlan, 2001; Anway, Cupp, Uzumcu, & Skinner, 2005). Moreover, epigenetic modifications, when they occur in the gonads, can be transmitted to the next generations as illustrated by Anway et al. (2005).

Some studies have reported the effects of prenatal BPA exposure on epigenetic mechanisms. Dolinoy et al., using the Agouti viable yellow mouse model, have shown that BPA exposure during pregnancy led to DNA hypomethylation of the offspring epigenome. Interestingly, this effect can be counteracted by maternal dietary supplementation (diet enriched with methyl group donors) (Dolinoy, Huang, & Jirtle, 2007). It will be necessary to examine the correlation between BPA-induced epigenetic alterations, modification in gene expression, and phenotype expression. But the absence of hypomethylation when supplementing maternal dietary during pregnancy suggests possible means for reducing risk of disease. Other studies supported epigenetic effects of BPA. Bromer et al. have shown that *in utero* exposure to high doses of BPA increased the expression of the homeobox gene *Hoxa 10* in the uterus of female offspring at 2 weeks of age. This was correlated with significant demethylation of specific CpG sites in the *Hoxa 10* gene, a gene necessary for uterus development. It is interesting to note that *Hoxa 10* DNA methylation was not altered in adult mice treated with these doses of BPA. It highlights the great vulnerability of the fetus and the existence of a critical developmental window for the epigenetic effects of EDCs (Bromer, Zhou, Taylor, Doherty, & Taylor, 2010). Other studies have shown an association between *in utero* exposure to BPA and hypomethylation of specific sites in genes involved in cancer development (Ho, Tang, Belmonte de Frausto, & Prins, 2006).



9. CONCLUSION

The fetus and child are particularly exposed to EDCs. Indeed, several of those EDCs cross the placental barrier or accumulate in maternal milk. Moreover, childhood behavior such as crawling or placing objects in their mouth increases exposure. Because of its high dependence on sex steroids and thyroid hormones for its maturation, the developing organism is very sensitive to any alteration of its hormonal environment. Epidemiological

studies have reported effects of EDCs on major hormone-dependent stages of development: fetal growth, sexual differentiation, puberty, brain development, and energy balance. However, the epidemiological data concerning the EDCs effects on the developing fetus and child are relatively scarce. Besides the challenges listed in Table 1.1, epidemiological studies present several other difficulties. Accurate quantification of exposure throughout pregnancy and childhood is difficult as described for BPA. In addition, for practical reasons, most epidemiological studies have to focus on one group of compounds and ignore other EDCs or risk factors. Genetic susceptibility to endocrine disruption or the effect of associated stresses of other nature is still to be studied.

An analysis of the literature underlines the need for identifying early and fine markers of EDC effects. Animal models can help to unravel the mechanisms of action of EDCs and discover new markers that could underlie alterations of function.

REFERENCES

- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., et al. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 1243–1250.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M., & Skinner, M. K. (2005). Epigenetic trans-generational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, *308*, 1466–1469.
- Bansal, R., & Zoeller, R. T. (2008). Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) do not uniformly produce agonist actions on thyroid hormone responses in the developing rat brain. *Endocrinology*, *149*, 4001–4008.
- Barker, D. J. (2004). The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition*, *23*, 588–595.
- Barker, D. J. P., Hales, C. N., Fall, C. H. D., Osmond, C., Phipps, K., & Clark, P. M. S. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, *36*, 62–67.
- Barker, D. J. P., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*, *1*, 1077–1081.
- Bay, K., Asklund, C., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A. M. (2006). Testicular dysgenesis syndrome: Possible role of endocrine disruptors. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *20*, 77–90.
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E. R., & Brandebourg, T. D. (2009). Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *304*, 49–54.
- Braun, J., Kalkbrenner, E., Calafat, A., Bernert, J., Ye, X., Silva, M., et al. (2011a). Variability and predictors of urinary Bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, *119*, 131–137.
- Braun, J. M., Kalkbrenner, A. E., Calafat, A. M., Yolton, K., Ye, X., Dietrich, K. N., et al. (2011b). Impact of early-life bisphenol A exposure on behaviour and executive function in children. *Pediatrics*, *128*, 873–882.

- Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., & Taylor, H. S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB Journal*, *24*, 2273–2280.
- Brouwer, A., Morse, D. C., Lans, M. C., Schuur, A. G., Murk, A. J., Klasson-Wheler, E., et al. (1998). Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormones system: Mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and Industrial Health*, *14*, 59–84.
- Chao, H. R., Wang, S. L., Lee, W. J., Wang, Y. F., & Pöpke, O. (2007). Levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from central Taiwan and their relation to infant birth outcome and maternal menstruation effects. *Environment International*, *33*, 239–245.
- Chevrier, J., Harley, K. G., Bradman, A., Gharbi, M., Sjödin, A., & Eskenazi, B. (2010). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and thyroid hormone during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 1444–1449.
- Chou, W. C., Chen, J. L., Lin, C. F., Chen, Y. C., Shih, F. C., & Chuang, C. Y. (2011). Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: A birth cohort study in Taiwan. *Environmental Health*, *3*, 10–94.
- Christiansen, S., Kortenkamp, A., Axelstad, M., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P. R., et al. (2012). Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: An exploratory study in rats. *International Journal of Andrology*, *35*, 303–316.
- Coll, A. P., Farooqi, I. S., Challis, B. G., Yeo, G. S., & O'Rahilly, S. (2004). Pro-opiomelanocortin and energy balance: Insights from human and murine genetics. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*, 2557–2562.
- Colon, I., Caro, D., Bourdony, C. J., & Rosario, O. (2000). Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environmental Health Perspectives*, *108*, 895–900.
- Costa, L. G., & Giordano, G. (2007). Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology*, *28*, 1047–1067.
- Denham, M., Schell, L. M., Deane, G., Gallo, M. V., Ravenscroft, J., & DeCaprio, A. P. (2005). Relationship of lead, mercury, mirex, dichlorodiphenyldichloroethylene, hexachlorobenzene, and polychlorinated biphenyls to timing of menarche among Akwesasne Mohawk girls. *Pediatrics*, *115*, 127–134.
- Den Hond, E., Roels, H. A., Hoppenbrouwers, K., Nawrot, T., Thijs, L., Vandermeulen, C., et al. (2002). Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited. *Environmental Health Perspectives*, *110*, 771–776.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L., Hauser, R., Prins, G., Soto, A., et al. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, *30*, 293–342.
- Dolinoy, D. C., Huang, D., & Jirtle, R. L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 13056–13061.
- Elsworth, J. D., Jentsch, J. D., Vandervoort, C. A., Roth, R. H., Jr, D. E., & Leranthe, C. (2013). Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates. *Neurotoxicology*, *35*, 113–120.
- Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., Ikka, T., & Harazono, A. (2001). Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, *15*, 505–523.

- Ema, M., Miyawaki, E., Hirose, A., & Kamata, E. (2003). Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reproductive Toxicology*, *17*, 407–412.
- Eriksson, P., Viberg, H., Jakobsson, E., Orn, U., & Fredriksson, A. (2002). A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: Uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicological Sciences*, *67*, 98–103.
- Eskenazi, B., Chevrier, J., Rauch, S. A., Kogut, K., Harley, K. G., Johnson, C., et al. (2012). In utero and childhood polybrominated diphenyl ether (PBDE) exposures and neurodevelopment in the CHAMACOS study. *Environmental Health Perspectives*, *121*, 257–262.
- Fénelich, P., Déchaux, H., Harthe, C., Gal, J., Ferrari, P., Pacini, P., et al. (2012). Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Human Reproduction*, *27*, 983–990.
- Fisher, J. S., Macpherson, S., Marchetti, N., & Sharpe, R. M. (2003). Human 'testicular dysgenesis syndrome': A possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction*, *18*, 1383–1394.
- Forrest, D., & Vennström, B. (2000). Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*, *10*, 41–52.
- Fowden, A. L., & Forhead, A. J. (2009). Hormones as epigenetic signals in developmental programming. *Experimental Physiology*, *94*, 607–625.
- Frederiksen, H., Sorensen, K., Mouritsen, A., Aksglaede, L., Hagen, C. P., Petersen, J. H., et al. (2012). High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. *International Journal of Andrology*, *35*, 216–226.
- Funabashi, T., Kawaguchi, M., Furuta, M., Fukushima, A., & Kimura, F. (2004). Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoneuroendocrinology*, *29*, 475–485.
- Galloway, T., Cipelli, R., Guralnik, J., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Corsi, A. M., et al. (2010). Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: Results from the InCHIANTI adult population study. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 1603–1608.
- Gauger, K. J., Giera, S., Sharlin, D. S., Bansal, R., Iannaccone, E., & Zoeller, R. T. (2007). Polychlorinated biphenyls 105 and 118 form thyroid hormone receptor agonists after cytochrome P4501A1 activation in rat pituitary GH3 cells. *Environmental Health Perspectives*, *115*, 1623–1630.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., & Low, F. M. (2011). The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today*, *93*, 12–18.
- Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C., et al. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, *303*, 1019–1022.
- Harley, K. G., Chevrier, J., Aguilar, Schall R., Sjödin, A., Bradman, A., & Eskenazi, B. (2011). Association of prenatal exposure to polybrominated diphenyl ethers and infant birth weight. *American Journal of Epidemiology*, *174*, 1166–1174.
- Heger, N. E., Hall, S. J., Sandrof, M. A., McDonnell, E. V., Hensley, J. B., McDowell, E. N., et al. (2012). Human fetal testis xenografts are resistant to phthalate-induced endocrine disruption. *Environmental Health Perspectives*, *120*, 1137–1143.
- Herbst, A. L., Ulfelder, H., & Poskanzer, D. C. (1971). Adenocarcinoma of vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *The New England Journal of Medicine*, *284*, 878–881.
- Herbstman, J. B., Sjödin, A., Apelberg, B. J., Witter, F. R., Halden, R. U., Patterson, D. G., et al. (2008). Birth delivery mode modifies the associations between prenatal polychlorinated biphenyl (PCB) and polybrominated diphenyl ether (PBDE) and neonatal thyroid hormone levels. *Environmental Health Perspectives*, *116*, 1376–1382.

- Herbstman, J. B., Sjödin, A., Kurzon, M., Lederman, S. A., Jones, R. S., & Rauh, V. (2010). Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 712–719.
- Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte de Frausto, J., & Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, *66*, 5624–5632.
- Horn, S., & Heuer, H. (2010). Thyroid hormone action during brain development: More questions than answers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *315*, 19–26.
- Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G., & vom Saal, F. S. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, *401*, 763–764.
- Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., Woo, J. G., Loftus, J., Wesley, Alexander J., & Ben-Jonathan, N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental Health Perspectives*, *116*, 1642–1647.
- Kirman, C. R., Aylward, L. L., Hays, S. M., Krishnan, K., & Nong, A. (2011). Bio-monitoring equivalents for DDT/DDE. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *60*, 172–180.
- Kobayashi, K., Ohtani, K., Kubota, H., & Miyagawa, M. (2010). Dietary exposure to low doses of bisphenol A: Effects on reproduction and development in two generations of C57BL/6J mice. *Congenital Anomalies (Kyoto)*, *50*, 159–170.
- Kodavanti, P. R., Coburn, C. G., Moser, V. C., MacPhail, R. C., Fenton, S. E., Stoker, T. E., et al. (2010). Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71: Neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects. *Toxicological Sciences*, *116*, 297–312.
- Koibuchi, N., & Iwasaki, T. (2006). Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocrine Journal*, *53*, 295–303.
- Kortenkamp, A. (2008). Low dose mixture effects of endocrine disruptors: Implications for risk assessment and epidemiology. *International Journal of Andrology*, *31*, 233–240.
- Krstevska-Konstantinova, M., Charlier, C., Craen, M., Du Caju, M., Heinrichs, C., de Beaufort, C., et al. (2001). Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: Evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Human Reproduction*, *16*, 1020–1026.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., & Aou, S. (2003). Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neuroscience Research*, *45*, 345–356.
- Kuriyama, S. N., & Chahoud, I. (2004). In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology*, *202*, 185–197.
- Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., et al. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*, *300*, 1303–1310.
- Langer, P. (2008). Persistent organochlorinated pollutants (PCB, DDE, HCB, dioxins, furans) and the thyroid. *Endocrine Regulations*, *42*, 79–104.
- LaRocca, J., Boyajian, A., Brown, C., Smith, S. D., & Hixon, M. (2011). Effects of in utero exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol on the adult male reproductive system. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, *92*, 526–533.
- Leijts, M. M., Koppe, J. G., Olie, K., van Aalderen, W. M. C., de Voogt, P., Vulsma, T., et al. (2008). Delayed initiation of breast development in girls with higher prenatal dioxin exposure; a longitudinal cohort study. *Chemosphere*, *73*, 999–1004.
- Leranth, C., Hajszan, T., Szigeti-Buck, K., Bober, J., & MacLusky, N. J. (2008a). Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex

- of ovariectomized nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, *105*, 14187–14191.
- Leranth, C., Szigeti-Buck, K., MacLusky, N. J., & Hajszan, T. (2008b). Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology*, *149*, 988–994.
- Lillicrop, K. A., Slater-Jefferies, J. L., Hanson, M. A., Godfrey, K. M., Jackson, A. A., & Burdge, G. C. (2007). Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *British Journal of Nutrition*, *97*, 1064–1073.
- Lomenick, J. P., Calafat, A. M., Melguizo Castro, M. S., Mier, R., Stenger, P., Foster, M. B., et al. (2010). Phthalate exposure and precocious puberty in females. *The Journal of Pediatrics*, *156*, 221–225.
- MacLusky, N. J., Hajszan, T., & Leranth, C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives*, *113*, 675–679.
- Main, K. M., Mortensen, G. K., Kaleva, M. M., Boisen, K. A., Damgaard, I. N., Chellakooty, M., et al. (2006). Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environmental Health Perspectives*, *114*, 270–276.
- Masuno, H., Iwanami, J., Kidani, T., Sakayama, K., & Honda, K. (2005). Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicological Sciences*, *84*, 319–327.
- Masuno, H., Kidani, T., Sehiya, K., Sakayama, K., Shiosaka, T., Yamamoto, H., 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.
- Mazda, A., Dodder, N. G., Abernathy, M. P., Hites, R. A., & Bigsby, R. M. (2003). Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environmental Health Perspectives*, *111*, 1249–1252.
- Melachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, *22*, 319–341.
- Meeker, J. D., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2010). Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environmental Science and Technology*, *44*, 1458–1463.
- Miao, M., Yuan, W., He, Y., Zhou, Z., Wang, J., Gao, E., et al. (2011a). In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, *91*, 867–872.
- Miao, M., Yuan, W., Zhu, G., He, X., & Li, D. K. (2011b). In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reproductive Toxicology*, *32*, 64–68.
- Mitchell, R. T., Childs, A. J., Anderson, R. A., van den Driesche, S., Saunders, P. T., McKinnell, C., et al. (2012). Do phthalates affect steroidogenesis by the human fetal testis? Exposure of human fetal testis xenografts to di-*n*-butyl phthalate. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*, 341–348.
- Ouyang, F., Perry, M. J., Venners, S. A., Chen, C., Wang, B., Yang, F., et al. (2005). Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. *Occupational and Environmental Medicine*, *62*, 878–884.
- Padmanabhan, V., Siefert, K., Ransom, S., Johnson, T., Pinkerton, J., Anderson, L., et al. (2008). Maternal bisphenol-A levels at delivery: A looming problem? *Journal of Perinatology*, *28*, 258–263.
- Palanza, P., Gioiosa, L., vom Saal, F. S., & Parmigiani, S. (2008). Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. *Environmental Sciences*, *108*, 150–157.

- Parent, A. S., Naveau, E., Gerard, A., Bourguignon, J. P., & Westbrook, G. L. (2011). Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *14*, 328–345.
- Philippat, C., Mortamais, M., Chevrier, C., Petit, C., Calafat, A. M., Ye, X., et al. (2012). Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environmental Health Perspectives*, *120*, 464–470.
- Pottenger, L. H., Domoradski, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z., & Waechter, J. M., Jr. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, *54*, 3–18.
- Ravelli, A. C., Van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., & Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *American Journal of Clinical Nutrition*, *70*, 811–816.
- Richter, C., Birnbaum, L., Farabolini, F., Newbold, R. R., Rubin, B., Talsness, C. E., et al. (2007). In vivo effects of Bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, *24*, 199–224.
- Rubin, B. S., Lenkowski, J. R., Schaeberle, C. M., Vandenberg, L. N., Ronsheim, P. M., & Soto, A. M. (2006). Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Neuroendocrinology*, *147*, 3681–3691.
- Rubin, B. S., Murray, M. K., Damassa, D. A., King, J. C., & Soto, A. M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives*, *109*, 675–680.
- Rudel, R. A., Gray, J. M., Engel, C. L., Rawsthorne, T. W., Dodson, R. E., Ackerman, J. M., et al. (2011). Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: Findings from a dietary intervention. *Environmental Health Perspectives*, *119*, 914–920.
- Ryan, K. R., Haller, A. M., Sorrel, J. E., Woods, S. C., Jandacek, R. J., & Seeley, R. J. (2010). Perinatal exposure to Bisphenol-A and the development of metabolic syndrome in CD-1 Mice. *Endocrinology*, *151*, 2603–2612.
- Salian, S., Doshi, T., & Vanage, G. (2009). Neonatal exposure of male rats to bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, *265*, 56–67.
- Sargis, R. M., Johnson, D. N., Choudhury, R. A., & Bradyl, M. J. (2010). Endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity*, *18*, 1283–1288.
- Schantz, S. L., Widholm, J. J., & Rice, D. C. (2003). Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environmental Health Perspectives*, *111*, 357–376.
- Shakkebaek, N. E., Rajpert-De, Meyts E., & Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: An increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction*, *16*, 972–978.
- Sharpe, R. M., & Skakkebaek, N. E. (2008). Testicular dysgenesis syndrome: Mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertility and Sterility*, *89*, 33–38.
- Sjödin, A., Wong, L. T., Jones, R. S., Park, A., Zhang, Y., Hodge, C., et al. (2008). Serum concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyl (PBB) in the United States population: 2003–2004. *Environmental Science and Technology*, *42*, 1377–1384. <http://dx.doi.org/10.1021/es702451p>.
- Somm, E., Schwitzgebel, V. M., Toulotte, A., Cederroth, C. R., Combescur, C., Nef, S., et al. (2009). Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives*, *117*, 1549–1555.
- Stapleton, H. M., Sjödin, A., Jones, R. S., Niehoser, S., Zhang, Y., & Patterson, D. G. (2008). Serum levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foam recyclers

- and carpet installers working in the United States. *Environmental Science and Technology*, 42, 3453–3458.
- Stevens, A., Begum, G., & White, A. (2011). Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: A mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? *European Journal of Pharmacology*, 660, 194–201.
- Strom, B. L., Schinnar, R., Ziegler, E. E., Barnhart, K. T., Sammel, M. D., Macones, G. A., et al. (2001). Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA*, 286, 807–814.
- Swan, S. H., Main, K. M., Liu, F., Stewart, S. L., Kruse, R. L., Calafat, A. M., et al. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1056–1061.
- Takahashi, O., & Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environmental Health Perspectives*, 108, 931–935.
- Tan, J., Loganath, A., Chong, Y. S., & Obbard, J. P. (2009). Exposure to persistent organic pollutants in utero and related maternal characteristics on birth outcomes: A multivariate data analysis approach. *Chemosphere*, 74, 428–433.
- Tando, S., Itoh, K., Yaoi, T., Ikeda, J., Fujiwara, Y., & Fushiki, S. (2007). Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain and Development*, 29, 352–356.
- Trasande, L., Attina, T. M., & Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA*, 308, 1113–1121.
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., et al. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33, 378–455.
- Vasilu, O., Muttineni, J., & Karmaus, W. (2004). In utero exposure to organochlorines and age at menarche. *Human Reproduction*, 19, 1506–1512.
- Viberg, H., Fredriksson, A., & Eriksson, P. (2003). Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behaviour, impairs learning and memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192, 95–106.
- Viberg, H., Mundy, W., & Eriksson, P. (2008). Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMKII and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis. *Neurotoxicology*, 29, 152–159.
- vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., et al. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology*, 24, 131–138.
- Vom Saal, F. S., & Myers, J. (2008). Bisphenol A and risk of metabolic disorders. *JAMA*, 300, 1353–1355.
- Wang, J., Sun, B., Hou, M., Pan, X., & Li, X. (2012). The environmental obesogen bisphenol A promotes adipogenesis by increasing the amount of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the adipose tissue of children. *International Journal of Obesity*, 37(7), 999–1005.
- Warner, M., Samuels, S., Mocarelli, P., Gerthou, P. M., Needham, L., Patterson, D. G., et al. (2004). Serum dioxin concentrations and age at menarche. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1289–1292.
- Wei, J., Lin, Y., Li, Y., Ying, C., Chen, J., Song, L., et al. (2011). Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology*, 152, 3049–3061.

- Welsh, M., Saunders, P., Fiskens, M., Scott, M., Hutchison, G., Smith, L., et al. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *Journal of Clinical Investigation*, *118*, 1479–1490.
- Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A., & Prins, J. B. (2006). Adiponectin—A key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *8*, 264–280.
- Wohlfahrt-Veje, C., Andersen, H. R., Jensen, T. K., Grandjean, P., Skakkebaek, N. E., & Main, K. M. (2012). Smaller genitals at school age in boys whose mothers were exposed to non-persistent pesticides in early pregnancy. *International Journal of Andrology*, *35*, 273–282.
- Wolff, M. S., Britton, J. A., Boguski, L., Hochman, S., Maloney, N., Serra, N., et al. (2008). Environmental exposures and puberty in inner-city girls. *Environmental Research*, *107*, 393–400.
- Wolff, M. S., Teitelbaum, S. L., Pinney, S. M., Windham, G., Liao, L., Biro, F., et al. (2010). Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 1039–1046.
- Wu, K., Xu, X., Liu, J., Guo, Y., Li, Y., & Huo, X. (2010). Polybrominated diphenyl ethers in umbilical cord blood and relevant factors in neonates from Guiyu, China. *Environmental Science and Technology*, *44*, 813–819.
- Xi, W., Wan, H. T., Zhao, Y. G., Wong, M. H., Giesy, J. P., & Wong, C. K. (2012). Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. *Environmental Science and Pollution Research International*, *19*, 2515–2527.
- Yang, C. Y., Yu, M. L., Wuo, H. R., Lai, T. J., HSu CC, C. C., Lambert, G., et al. (2005). The endocrine and reproductive function of the female Yucheng adolescents prenatally exposed to PCBs/PCDFs. *Chemosphere*, *61*, 355–360.
- Zhang, J. M., Konkle, A. T., Zup, S. L., & McCarthy, M. M. (2008). Impact of sex and hormones on new cells in the developing rat hippocampus: A novel source of sex dimorphism? *European Journal of Neuroscience*, *27*, 791–800.
- Zoeller, R. T., Dowling, A. L. S., & Vas, A. (2000). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/Neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology*, *141*, 181–189.
- Zoeller, R. T., & Rovet, J. (2004). Timing of thyroid hormone action in the developing brain: Clinical observations and experimental findings. *Journal of Neuroendocrinology*, *16*, 809–818.

LA PERTURBATION ENDOCRINIENNE : entre enjeux de recherche, enjeux de santé publique et enjeux de pratique quotidienne

J. FUDVOYE (1, 2), D. FRANSSSEN (1), E. NAVEAU (1), A. PINSON (1), A. GERARD (1), J-P. BOURGUIGNON (1, 2),
A.S. PARENT (1, 2)

RÉSUMÉ : Les périodes fœtale et postnatale précoce sont identifiées comme critiques pour les conséquences de l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PEs) sur la santé à long terme. L'exposition aux PEs, en modifiant l'environnement hormonal du fœtus ou du jeune enfant, peut interférer avec la mise en place du contrôle de la balance énergétique (obésité, syndrome métabolique) et du contrôle de la reproduction (modification du timing pubertaire, infertilité, néoplasie) et peut influencer le développement du cortex cérébral. La démonstration formelle de l'implication d'un PE donné reste difficile à établir chez l'humain puisque nous sommes exposés à des mélanges de PEs ubiquitaires dont la rémanence dans l'environnement et l'organisme est variable et dont les effets surviennent après un délai variable et parfois très long. Les PEs peuvent avoir des effets à faibles doses sans suivre une relation dose-réponse nécessairement linéaire et, dès lors, l'endocrinologie ne peut définir un seuil de toxicité. La femme enceinte, le nouveau-né et le nourrisson sont donc des cibles privilégiées. Le rôle du praticien reste toutefois compliqué et comporte davantage de questions que de réponses. Comment devenir un praticien-citoyen-éducateur qui formule des recommandations justifiées, applicables, dénuées d'alarmisme contre-productif et réactualisées régulièrement...dans une société qui pose les cadres réglementaires nécessaires ?

MOTS-CLÉS : *Perturbation endocrinienne - Origine fœtale des pathologies de l'adulte - Mécanismes épigénétiques - Santé publique*

DÉFINITION DE LA PERTURBATION ENDOCRINIENNE

Un PE est «une substance exogène ou un mélange de substances qui altère une ou des fonctions du système endocrinien et, conséquemment, cause des effets négatifs sur la santé d'un organisme, de sa progéniture ou d'une population» (OMS 2002). Le caractère ubiquitaire de ces substances représente un risque substantiel pour la santé publique. Quelques exemples de perturbateurs endocriniens sont repris dans le tableau I.

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir en tant qu'agonistes (agonistes oestro-

ENDOCRINE DISRUPTION: A CHALLENGE IN RESEARCH, PUBLIC HEALTH AND CLINICAL PRACTICE

SUMMARY : Epidemiological and experimental data highlight the fetal and early postnatal life as critical periods for the effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs), since exposure to EDCs during these periods can predispose to disease later in life. EDCs' effects include disorders of the reproductive system throughout life (abnormalities of sexual differentiation, infertility or subfertility and some neoplasia) and disorders of energy balance (obesity and metabolic syndrome). They could also influence the development of the cerebral cortex. However, the demonstration of the involvement of a single EDC remains difficult in human since we are virtually exposed to a mixture of several ubiquitous EDCs which are variably persistent in the environment and the body and have lifelong consequences. Moreover, since their dose-response relationship can be non-monotonic, setting a threshold dose for EDCs effects has become meaningless. Pregnant women, newborns and young children appear to be mostly at risk. However, the role of the physician remains difficult and raises several questions: how can we formulate justified, applicable and updated recommendations that are not counterproductive or alarmist...in a society that has to take the necessary steps to regulate production and protect the population?

KEYWORDS : *Endocrine disruption - Fetal origin of adult disease - Epigenetic - Public health*

géniques, agonistes des récepteurs PPAR- γ) ou antagonistes (antagonistes androgéniques, antagonistes des hormones thyroïdiennes) des récepteurs hormonaux. Ils sont également capables d'altérer la production ou la métabolisation des hormones. Il a été montré récemment que certains perturbateurs étaient capables de causer des modifications épigénétiques potentiellement transmissibles aux générations suivantes.

EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LA SANTÉ

Le tableau II résume les différents systèmes pouvant être affectés par l'exposition aux PEs.

EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LE DÉVELOPPEMENT PUBERTAIRE

Un grand nombre des études réalisées chez l'animal ont identifié la période périnatale comme étant particulièrement sensible aux

(1) Unité de Neuroendocrinologie du Développement, GIGA Neurosciences, Université de Liège, Site Sart-Tilman.

(2) Service de Pédiatrie, CHU de Liège, Site NDB, Chênée.

TABLEAU I. EXEMPLES DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS EN FONCTION DE LEUR ORIGINE ET DE LEUR FONCTION

Origine	Fonction	Composés
Industrie	Incinération, isolation	Dioxines, biphényles polychlorés (PCBs)
	Surfactants, agents nettoyants	Alkylphénols, tributylétain
Agriculture	Pesticides organochlorés, insecticides	DDT, méthoxychlore, dieldrine, lindane, chlordécone
	Herbicides, Fongicides	Atrazine, vinclozoline
	Phyto-oestrogènes, (naturels)	Génistéine, coumestrol
Usage domestique	Plastifiants	Phthalates
	Résines, matières plastiques	Bisphénol A (BPA)
	Retardateurs de flamme	Biphényles polybromés (PBBs)
	Cosmétiques	Parabènes
	Contraceptifs	Oestrogènes synthétiques, DES

TABLEAU II. EFFETS POSSIBLES DES PEs SUR LA SANTÉ, EN RELATION AVEC LES SYSTÈMES TOUCHÉS ET LES HORMONES AVEC LESQUELLES ILS INTERFÈRENT

Site et aspect du développement	Manifestations phénotypiques	Système hormonal affecté
Cerveau	Troubles cognitifs et psychomoteurs	Hormones thyroïdiennes
Différenciation sexuelle	Hypospade, cryptorchidie, diminution de la distance ano-génitale	Stéroïdes sexuels
Système reproducteur <i>Tractus génital féminin</i> <i>Sein</i> <i>Testicule</i> <i>Prostate</i> <i>Neuroendocrinien</i>	Malformations, cancer Malformations, thélarche prématuroe, cancer Oligospermie, cancer Cancer Modifications du timing pubertaire, troubles de l'ovulation	Stéroïdes sexuels
Tissu adipeux et balance énergétique	Obésité viscérale, syndrome métabolique	Récepteur PPAR- γ ; stéroïdes sexuels

effets des PEs sur le développement pubertaire, probablement en raison du rôle joué par les stéroïdes sexuels dans la maturation sexuelle. L'évaluation de l'action des PEs sur la puberté est complexe en raison de l'implication d'effets au niveau d'organes périphériques (seins, uté-

rus, testicules) et d'effets au niveau du contrôle hypothalamique de la puberté. De plus, les effets des PEs peuvent résulter d'une exposition précédant directement la période pubertaire ou d'une exposition plus précoce durant la vie périnatale puisque le timing pubertaire est programmé durant cette période (1).

Notre équipe a montré que le risque de puberté précoce centrale était nettement plus élevé chez les petites filles migrantes et était associé à une exposition au dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un pesticide oestrogénique utilisé dans la lutte contre la malaria. Nous avons aussi observé que l'exposition précoce de rats femelles au DDT pouvait accélérer la maturation de la sécrétion de GnRH et était associée à une survenue précoce de la puberté (2). Récemment, nous avons étudié les effets d'une exposition précoce au diéthylstilbestrol (DES) sur le timing pubertaire (3). Ce composé oestrogénique est actuellement interdit, mais toujours utilisé en laboratoire en tant que PE oestrogénique de référence. Les femelles exposées à la dose élevée présentaient une puberté avancée par rapport aux animaux contrôles. De manière opposée, les animaux exposés à la faible dose de DES montraient un retard pubertaire, associé à un ralentissement de la sécrétion de GnRH. Ces données illustrent la complexité de l'étude des PEs présentant des courbes dose-réponse non monotones.

EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE

Des données récentes suggèrent l'implication possible de l'exposition aux PEs dans l'augmentation constante de l'incidence du syndrome métabolique et/ou de l'obésité. Certaines études animales suggèrent, en effet, qu'une exposition périnatale aux PEs, en modifiant l'environnement hormonal du fœtus, pourrait être associée à une altération du contrôle de la balance énergétique qui persisterait durant la vie adulte. Ces données reflètent l'hypothèse de l'origine développementale des pathologies de l'adulte établie initialement par Barker.

Ainsi, il a été démontré chez l'animal qu'une exposition précoce aux PEs tels que le bisphénol A (BPA) pourrait altérer la différenciation du tissu adipeux, mais également le contrôle hypothalamique de la balance énergétique et conduire à un risque accru d'obésité et de syndrome métabolique plus tard dans la vie (4).

Les effets du BPA sur la balance énergétique sont aussi suggérés par des études réalisées

chez l'homme : Lang et al ont montré une corrélation positive entre les taux urinaires de BPA et le risque de maladies cardio-vasculaires et de diabète (5, 6). Il faut noter que les taux urinaires de BPA étaient mesurés à l'âge adulte. Aucune information n'est disponible concernant l'exposition au BPA tôt dans l'enfance, période qui apparaît comme critique dans les études animales. Une autre étude réalisée aux Etats-Unis également, a rapporté une prévalence et un risque accrus d'obésité en fonction de l'excrétion urinaire de BPA, mais cette fois dans une population de sujets âgés de 6 à 19 ans (7). Cependant, le lien entre les deux observations reste difficile à établir : en effet, on peut supposer que les enfants obèses consomment plus de nourriture en conserve, boivent plus de sodas sucrés et sont donc exposés à des taux plus élevés de BPA, raison pour laquelle on retrouve chez eux les plus hautes concentrations urinaires en BPA.

On le voit, l'établissement d'un lien solide entre obésité et exposition au BPA est difficile compte tenu de son ubiquité, de l'importance de la dose et de la fenêtre d'exposition.

EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LE DÉVELOPPEMENT DU CORTEX ET DE L'HIPPOCAMPE

En raison du rôle prépondérant des hormones thyroïdiennes et des stéroïdes sexuels dans la régulation du développement cortical, une modification de la fonction de ces hormones par les PE pourrait mener à des altérations du développement cortical et des fonctions cérébrales (8). Nous illustrons ici les effets de deux classes de perturbateurs de la fonction thyroïdienne.

Les polychlorobiphényles (PCBs) sont des PE persistants qui ont largement été utilisés en tant qu'isolants et lubrifiants dans l'industrie. A ce jour, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation négative entre le taux de PCBs dans le lait maternel et le quotient intellectuel des enfants plusieurs années après l'exposition (9). Les effets des PCBs sur le QI constituent un problème de santé publique majeure en raison de leur persistance et de leur ubiquité. Ils sont connus pour réduire le taux circulant de thyroxine, probablement via une diminution de la synthèse des hormones thyroïdiennes et une augmentation de leur métabolisme. Ces altérations pourraient en partie expliquer les effets des PCBs sur l'apprentissage et la mémoire (10).

Les polybromodiphényléthers (PBDE), largement utilisés en tant que retardateur de flamme, sont également associés à des déficits cognitifs. Ils sont semi-volatils et se retrouvent dans la poussière de maison. Les jeunes enfants y sont donc particulièrement exposés (11). Ils semblent également entraîner une diminution des taux sériques de thyroxine (12) et sont associés à des déficits de l'attention, de la coordination motrice fine et des fonctions cognitives chez de jeunes enfants de 5 à 7 ans (13) exposés en période périnatale.

EFFETS ÉPIGÉNÉTIQUES DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Les mécanismes épigénétiques apparaissent comme les « senseurs » de l'environnement dans lequel évolue le fœtus. En quelque sorte, ces mécanismes épigénétiques constituent une réponse à l'exposition aux facteurs environnementaux tels que les facteurs nutritionnels ou les PE. Ainsi, grâce à un modèle de souris dont la couleur du pelage varie en réponse à des modifications de la méthylation de l'ADN, Dolinoy et coll. ont mis en évidence des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau du génome de la descendance de femelles exposées au BPA durant la gestation et durant la lactation (14). De façon intéressante, l'hypométhylation de l'ADN induite par l'exposition au BPA est supprimée si les mères sont exposées à un régime riche en donneurs méthyls (acide folique, vitamine B12) (14). Chez l'humain, une étude épidémiologique menée chez des adolescentes prépubères a permis de montrer que des taux urinaires élevés de BPA étaient associés à une diminution de la méthylation de certains gènes impliqués dans les fonctions immunes, les activités de transport, le métabolisme et l'activité caspase (15).

Nos études actuelles visent donc à étudier les effets d'une exposition gestationnelle au BPA sur la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes dans le placenta murin afin d'identifier des marqueurs précoces des effets de l'exposition aux PE avec l'avantage que le placenta constitue un matériel potentiellement utilisable chez l'humain; il pourrait apparaître comme un marqueur de l'exposition précoce aux perturbateurs endocriniens du fœtus et ainsi justifier la mise en place de mesures préventives vis-à-vis des femmes enceintes.

LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : UN ENJEU DE SANTÉ PUBLIQUE ET DE PRATIQUE QUOTIDIENNE

L'incidence des maladies endocriniennes n'a cessé d'augmenter au cours des 40 à 50 dernières années. En effet, de multiples études épidémiologiques rapportent une diminution de la fertilité masculine, mais une augmentation de l'incidence des retards de croissance intra-utérins ainsi que de l'obésité, du syndrome métabolique et des cancers hormono-dépendants (rapport WHO). Alors que les données épidémiologiques sont actuellement insuffisantes, les données obtenues chez l'animal suggèrent une relation causale avec l'exposition à certains PE. En plus de ces pathologies endocriniennes, il apparaît que les anomalies du développement cérébral sont également en augmentation. Les études épidémiologiques ont identifié plus de 200 composés chimiques présents dans l'environnement associés à des anomalies du développement cérébral (16). Parmi ceux-ci, de nombreux PE tels que des retardateurs de flammes et des pesticides. Sur le plan mondial, on estime que ces polluants sont responsables d'une perte de points de quotient intellectuel comparable à la perte causée par les naissances prématurées ou les traumatismes crâniens (16).

En raison de leur ubiquité, les PE représentent donc un risque de santé à l'échelle des populations aussi bien que de l'individu. Huit cents composés chimiques sont actuellement considérés comme PE. Cependant, la majorité des nouvelles substances mises sur le marché ne sont pas testées pour leurs éventuelles propriétés toxiques ou de perturbation endocrinienne. Nous bénéficions en Europe d'une directive adoptée en 2006 (REACH), mais qui ne concerne que les substances dont la production excède la tonne. Deux directives ont été adoptées depuis lors, une sur les pesticides et, l'autre, sur les biocides. La Commission Européenne est occupée à revoir ces réglementations (définition d'un PE, du ou des risques liés à son utilisation et des méthodes pour les mettre en évidence). Jusqu'ici, les agences de protection de l'environnement et de la santé ont défini des doses quotidiennes acceptables pour une série de perturbateurs endocriniens analysés de façon isolée. Cependant, nous sommes quotidiennement exposés non à un seul, mais à un mélange complexe de perturbateurs. Ces substances associées, chacune à une dose inactive, peuvent entraîner des effets non prédits par leur étude individuelle (17). Cet aspect n'est pas pris en compte lorsqu'une dose minimale

non dangereuse est définie pour une substance. De plus, plusieurs études ont mis en évidence une relation dose-réponse de type non linéaire, notamment pour le BPA (courbe en U inversé). Ceci signifie que la dose la plus faible peut avoir un effet plus puissant en fonction des paramètres biologiques étudiés (18). Ces données récentes soulignent la nécessité d'étudier les courbes dose-réponse non linéaires ainsi que les effets des mélanges complexes de PE.

Il apparaît également que la latence peut être très longue entre l'exposition aux PE et la survenue possible des effets délétères sur la santé, ce qui rend difficile l'établissement d'un lien de cause à effet entre ces deux périodes chez l'humain. De plus, les PE ont une persistance variable dans l'organisme et dans l'environnement (19, 20). Ces aspects rendent particulièrement difficile l'étude des effets des PE chez l'humain et soulignent l'importance des recherches animales. Le tableau III reprend les principales difficultés auxquelles nous sommes confrontés lorsqu'il s'agit de déterminer les effets possibles des PE sur la santé chez l'homme.

Par ailleurs, la possibilité d'effets épigénétiques entraîne la possibilité d'une transmission héréditaire des effets des PE. En effet, les effets épigénétiques de la vinclozoline, un fongicide, par exemple, sont observés jusqu'à la quatrième génération chez le rat (21).

Il n'y a, dès lors, pas d'alternative, actuellement, à l'application du principe de précaution, dans l'attente de données additionnelles chez l'animal et l'homme et, surtout, de dispositions prises par les pouvoirs publics. Celles-ci portent non seulement sur l'introduction ou le maintien de certaines substances dans l'environnement, mais aussi sur l'étiquetage et l'information des consommateurs. C'est un défi à l'heure de la mondialisation du marché et des enjeux éco-

TABLEAU III. FACTEURS RESPONSABLES DE DIFFICULTÉS DANS LA DÉMONSTRATION ET LA GESTION DE LA PERTURBATION ENDOCRINIENNE

<ol style="list-style-type: none"> 1. Rémanence variable dans l'organisme et l'environnement (DDE, PCBs,...) 2. Latence très longue entre l'exposition et les effets. 3. Facteurs de sensibilité individuelle (périodes critiques du développement, polymorphisme génique, interaction avec des « stressseurs » autres que chimiques). 4. Effets variables selon la période d'exposition et la durée d'exposition. 5. Effets de mélanges à faibles doses. 6. Relation dose-réponse non conventionnelle. 7. Mécanismes multiples, effets épigénétiques.

nomiques qui la sous-tendent. Une attention particulière sera portée aux femmes enceintes ainsi qu'aux enfants. Le tableau IV résume certaines questions que le praticien peut inciter la femme enceinte ou la jeune maman à se poser et, si elle y répond par l'affirmative, à l'encou-

TABLEAU IV. QUESTIONS PERTINENTES ET NON LIMITATIVES POUR ÉVALUER LE RISQUE D'EXPOSITION DE LA FEMME ENCEINTE, DU NOUVEAU-NÉ ET DU JEUNE ENFANT AUX PÉS ET INCITER À ADAPTER LES COMPORTEMENTS QUOTIDIENS ET SUIVRE AINSI UN PRINCIPE DE PRÉCAUTION

Questions	PEs notamment impliqués
Préalable : Est-ce que je fume du tabac et/ou consomme de l'alcool, deux toxiques à éviter avant tous les autres ?	Plusieurs dizaines de substances liées au tabac
Est-ce que j'utilise beaucoup de produits cosmétiques ? Est-ce que je m'assure qu'ils ne contiennent pas de parabènes ?	Parabènes, ...
Est-ce que je prête attention à privilégier les aliments et boissons contenus en récipients en verre plutôt qu'en plastique ou en métal quand j'ai le choix ?	Bisphénol A, phtalates, ...
Est-ce que je réchauffe les aliments au micro-onde dans des récipients en plastique ?	Bisphénol A, phtalates, ...
Est-ce que les biberons et récipients utilisés pour nourrir mon jeune enfant sont en plastique sans garantie qu'ils soient exempts de bisphénol ?	Bisphénol A, phtalates, ...
Est-ce que je consomme des aliments sans m'informer, quand c'est possible, de leurs conditions de culture ou d'élevage ?	Pesticides, ...
Est-ce que je consomme plusieurs fois par semaine des poissons comme le thon ou le saumon qui sont au sommet de la chaîne alimentaire ?	PCBs, DDE, Pesticides, ...
Est-ce que les jouets en plastiques ou caoutchouc que je mets à disposition de mon enfant sont exempts de bisphénol et de phtalates ?	Bisphénol A, phtalates, ...
Est-ce que j'envisage de renouveler du mobilier en tissu ou cuir ou des fournitures comme du tapis plain ou des rideaux ?	Biphényles polybromés, ...
Est-ce que j'envisage de repeindre la chambre de mon (futur) enfant ou d'utiliser des produits d'entretien (vernis, ...) en grande quantité ?	Bisphénol A, phtalates, ...
Est-ce que j'ai l'habitude d'utiliser dans mon logement ou ma voiture des désodorisants d'intérieur et/ou des insecticides en tablettes ou en sprays ?	Phtalates, ...

rager à modifier les comportements concernés pour réduire, quand et où c'est possible, son exposition et celle de son enfant aux PEs. Pour l'information du praticien, certains parmi les PEs concernés par ces questions sont mentionnés. Les questions proposées ne sont pas limitatives et nécessitent une constante adaptation en fonction des nouvelles données de la recherche et des dispositions futures prises par les pouvoirs publics. En effet, de telles dispositions pourraient modifier le fondement de certaines questions.

BIBLIOGRAPHIE

- Fudvoye J, Bourguignon JP, Parent AS.— Endocrine-disrupting chemicals and human growth and maturation : a focus on early critical windows of exposure. *Vitam Horm*, 2014, **94**, 1-25.
- Rasier G, Parent AS, Gérard A, et al.— Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod*, 2007, **77**, 734-742.
- Franssen D, Ioannou Y, Alvarez-Real A, et al.— Pubertal timing after neonatal diethylstilbestrol exposure in female rats: neuroendocrine versus peripheral effects and additive role of prenatal food restriction. *Reprod Toxicol*, 2013, **44**, 63-72.
- Wei J, Lin Y, Li Y, et al.— Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology*, 2011, **152**, 3049-3061.
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett AL, et al.— Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*, 2008, **300**, 1303-1310.
- Vom Saal FS, Myers J.— Bisphenol A and risk of metabolic disorders. *JAMA*, 2008, **300**, 1353-1355.
- Trasande L, Attina TM, Blustein J.— Association between urinary Bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA*, 2012, **308**, 1113-1121.
- Parent AS, Naveau E, Gerard A et al.— Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2011, **14**, 328-345.
- Stewart P, Lonky E, Reihman J, et al.— The relationship between prenatal PCB exposure and intelligence (IQ) in 9-year-old children. *Environ Health Perspect*, 2008, **116**, 1416-1422.
- Naveau E, Pinson A, Gérard A, et al.— Alteration of rat fetal cerebral cortex development after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls. *PLoS One*, 2014, **9**, e91903.
- Stapleton HM, Sjodin A, Jones RS, et al.— Serum levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foam recyclers and carpet installers working in the United States. *Environ Sci Technol*, 2008, **42**, 3453-3458.
- Herbstman JB, Sjodin A, Apelberg BJ, et al.— Birth delivery mode modifies the associations between prenatal polychlorinated biphenyl (PCB) and polybrominated diphenyl ether (PBDE) and neonatal thyroid hormone levels. *Environ Health Perspect*, 2008, **116**, 1376-1382.

13. Eskenazi B, Chevrier J, Rauch SA, et al.— In utero and childhood Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) exposures and neurodevelopment in the CHAMACOS study. *Environ Health Perspect*, 2012, **121**, 257-262.
14. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL.— Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**, 13056-13061.
15. Kim JH, Rozek LS, Soliman AS, et al.— Bisphenol A-associated epigenomic changes in prepubescent girls: a cross-sectional study in Gharbiah, Egypt. *Environ Health Perspect*, 2013, **16**, 12-33.
16. Grandjean P, Landrigan PJ.— Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*, 2014, **13**, 330-338.
17. Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, et al.— Synergistic Disruption of External Male Sex Organ Development by a Mixture of Four Antiandrogens. *Environ Health Perspect*, 2009, **117**, 1839-1846.
18. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD.— Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, **304**, 49-54.
19. Rudel RA, Gray JM, Engel CL, et al.— Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention. *Environ Health Perspect*, 2011, **119**, 914-920.
20. Kirman CR, Aylward LL, Hays SM, et al.— Biomonitoring equivalents for DDT/DDE. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011, **60**, 172-180.
21. Anway MD, Leathers C, Skinner MK.— Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*, 2006, **147**, 5515-5523.

Les demandes de tirés à part sont à adresser à
Mme. A.S. Parent, Service de Pédiatrie, CHU de
Liège, Belgique.
Email : asparent@ulg.ac.be

Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 33 (2019) 101300



Contents lists available at ScienceDirect

Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/beem

Endocrine disruptors and possible contribution to pubertal changes



Julie Fudvoye, Pediatric Endocrinologist, Associate Chief of
Clinic and Graduate Student ^{a, b},
David Lopez-Rodriguez, Psychologist and Graduate Student ^a,
Delphine Franssen, PhD in Biomedical Science and Research
Scientist ^a,
Anne-Simone Parent, Pediatric Endocrinologist, Associate
Professor and Research Group Leader ^{a, b, *}

^a Neuroendocrinology Unit, GIGA Neurosciences, University of Liège, Sart-Tilman, B-4000, Liège, Belgium
^b Department of Pediatrics, CHU de Liège, Rue de Gaillarmont 600, B-4032, Chênée, Belgium

A R T I C L E I N F O

Article history:
Available online 27 July 2019

Keywords:
endocrine disruptors
environment
puberty
secular trend
gonadotropin releasing hormone
hypothalamus

The onset of puberty strongly depends on organizational processes taking place during the fetal and early postnatal life. Therefore, exposure to environmental pollutants such as Endocrine disrupting chemicals (EDCs) during critical periods of development can result in delayed/advanced puberty and long-term reproductive consequences. Human evidence of altered pubertal timing after exposure to endocrine disrupting chemicals is equivocal. However, the age distribution of pubertal signs points to a skewed distribution towards earliness for initial pubertal stages and towards lateness for final pubertal stages. Such distortion of distribution is a recent phenomenon and suggests environmental influences including the possible role of nutrition, stress and endocrine disruptors. Rodent and ovine studies indicate a role of fetal and neonatal exposure to EDCs, along the concept of early origin of health and disease. Such effects involve neuroendocrine mechanisms at the level of the hypothalamus where homeostasis of

* Corresponding author. Developmental Neuroendocrinology Unit, GIGA Neurosciences, University of Liège, Sart-Tilman, B-4000, Liège, Belgium.

E-mail address: asparent@uliege.be (A.-S. Parent).

<https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101300>
1521-690X/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

reproduction is programmed and regulated but also peripheral effects at the level of the gonads or the mammary gland.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Puberty represents a crucial milestone in one's reproductive life. For this reason, any effect of the environment on pubertal timing might announce later consequences on reproduction. For the last 20 years, data has accumulated suggesting changes in pubertal timing and a possible role for exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs). This review will summarize the recent data regarding secular trends in age at puberty in boys and girls as well as the likely increase in central precocious puberty incidence in girls. Finally, we will review the epidemiological and animal data suggesting a role for endocrine disrupting chemicals in the reported changes in pubertal timing.

Secular trend in pubertal timing in girls

Because menarcheal age and breast development are clinically easier to assess, data regarding female puberty is significantly more abundant than male data.

A reduction in menarcheal age had been reported in European countries [1] as well as in the United States [2] between 1890 and 1960. An overall advancement in female pubertal timing that averaged 4 years in a century was derived from those observations [2]. This evolution is considered to be due to the improvement of socioeconomic conditions and nutritional status. The hypothesis is consistent with the Frisch and Revell theory according to which a critical amount of body fat is necessary in order to enter puberty [3]. Since 1960, the secular advancement in menarche has appeared to cease in countries such as Belgium [2,4]. In the United States, menarcheal age remained stable, around 12.7–12.9 years, between 1973 and 1997 [5–7] but a recent longitudinal study has reported a slightly lower median age at menarche (12.2 years) in New-York, Ohio and California [8]. A similarly moderate decrease in age at menarche was reported in Danish cohorts between 1991 and 2006 (13.42 and 13.13 years, respectively) [9]. Interestingly, a stronger secular decrease persists in emerging countries such as India or China [10,11]. However, an extensive spatial heterogeneity regarding age at menarche still persists in those regions of the world.

Starting in the nineties, several large US studies have reported a persistent secular decrease in age at onset of breast development in girls compared to the mid-20th century. A publication from the American Academy of Pediatrics reported a mean age at B2 of 10 years in White American girls and 8.9 years in African-American [7]. These findings generated comments on the possible overestimation of breast development because assessment was made through visual inspection only, whereas palpation may be required to distinguish between adipose and glandular tissue. The Third National Health and Nutrition Examination Study (NHANES III), a population-based study conducted between 1988 and 1994, confirmed the findings and found the median age of thelarche to be 10.4 years in white Americans and 9.5 in black Americans [12]. Following those observations, in 2007, an expert panel stated that the data were sufficient to suggest a trend toward earlier breast development in the United States over the second half of the 20th century [13]. A more recent longitudinal study by Biro et al. observed a continuous decrease in age at B2 in American girls aged 6–8 years at enrollment [14]. Mean age of breast stage 2 was 8.8 years for black, 9.2 years for Hispanic, 9.6 for non-Hispanic white, and 9.9 years for Asian participants, illustrating the influence of race/ethnicity on breast maturation. Notably, body mass index had a greater effect on age at menarche than did race and ethnicity. Those data are consistent with data collected in Scandinavian countries: The Copenhagen Puberty Study reported an advance of nearly one year for attainment of Tanner stage 2 between girls from the 1991 cohort and girls from the 2006 cohort [9]. Recent European studies have also highlighted the existence of a non-Gaussian distribution of the age at B2 in girls with a distribution skewed to the left, meaning that more girls start puberty early than late. A recent longitudinal study in Greek girls showed a median age at B2

of 10 years with the 25th and 75th centiles being 9.2 and 10.6 years, respectively and a skewness of -0.44 [15]. Cross-sectional data in Belgium [4] were consistent with those findings: the distribution of age at B2 was skewed towards earliness whereas the distribution for age at menarche was skewed towards lateness. The negative distortion of age at B2 appears to be more marked in recent studies [4]. These observations suggest that during the last decades of the 20th century, some girls tended to enter puberty earlier and some to end puberty later, which was not reflected by changes in median ages. Very recently, Woelfle et al. assessed secular trends on pubertal development in more than 7000 patients with Turner syndrome [16]. They found a decline in the age at spontaneous thelarche of about 2 years between those born before 1980 and those born in 2000–2004. The prevalence in spontaneous puberty onset appeared to increase between 1980 and 1995–1999. As in healthy girls, one can speculate that the increase in weight SDS and exposure to EDCs explains such secular trend in pubertal timing.

The secular changes in age at pubertal onset and changes in distribution pattern indicate a potential role for environmental factors. However, the causal relationship is extremely difficult to establish. When searching for possible causes and mechanisms of changes in pubertal timing, the default hypothesis is hypothalamic-pituitary maturation. Peripheral mechanisms, however, can coexist with central mechanisms or secondarily facilitate them. Such a concept is supported by the dissociation between advancement in age at onset of breast development in Denmark, the Netherlands, Belgium or the United States without parallel change in menarcheal age. Two different pubertal events can respond differently to hormonal and EDC influences. Moreover, a single pubertal event can be influenced by different endocrine pathways. For instance, breast development can be due to ovarian estrogen secretion under the stimulation by pituitary gonadotropins and/or estrogenic effects associated with exposure to EDCs. The interpretation of the mechanistic role of sex steroids or related environmental factors is complex due to the multiple sites where they can interact between the hypothalamus and the peripheral target tissues. Interestingly, there was no difference in serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone between the two Danish cohorts in 1991 and 2006 which would suggest that the change in timing of breast development would not result from an early activation of the pituitary-gonadal axis. However, multiple animal models indicate that early exposure to EDC can alter the hypothalamic programming of puberty (see below).

The role of the obesity epidemics in puberty timing deserves to be developed as well. Because nutritional status is known to be a determinant of puberty, a causal relationship between obesity and earlier onset of puberty has been hypothesized. Evidence has accumulated that a sufficient amount of fat mass signaling to the neuroendocrine system through leptin is a prerequisite to the onset of puberty. Leptin can stimulate pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion and is indeed necessary but not sufficient to account for onset of puberty [17]. It also appears that both energy balance and pubertal timing share common regulatory factors that could be jointly influenced. Notably, in Biro's study, body mass index (BMI) was the strongest predictor of earlier age at breast development [8]. In their study, white non-Hispanic participants with BMI <85th percentile had similar age at breast development as white girls in 1997 [7], indicating that the secular trend had plateaued in that group. Other studies have suggested an association between body weight and puberty timing. Adiposity rebound (BMI increase between 2 and 8 years) has been linked with earlier growth spurt in Danish boys and girls [18]. Aksglaede et al. have found that BMI at 7 years is a significant predictor of age at pubertal growth spurt in a cohort of more than 150,000 boys and girls [18]. However, secular trend towards early onset of puberty is found in all BMI categories suggesting involvement of other factors than peripubertal weight.

Secular trend in pubertal timing in boys

Pubertal timing in boys being relatively more difficult to assess, the number of available studies is significantly lower. In the 1990s, data collected from the American population-based study NHANES III suggested an advance in age at onset of genital development [12,19,20]. However, due to the lack of reliable data from the previous population based study NHESIII [21], no conclusions could be made regarding the trend in pubertal onset in boys. Only a limited number of secular trend studies exist in Europe, and they did not support a secular trend toward earlier age at pubertal onset in boys between the 1960s and the 1990s [22,23]. Recent data collected in Scandinavian countries are consistent with an

earlier pubertal timing: the age at attainment of testicular volume above 3 ml was about 3 months earlier in the 2006–2008 cohort compared to the 1991–1993 cohort [24]. Significantly higher LH, but not testosterone, levels were found in 2006–2008 compared to 1991–1993 and BMI Z-score increased significantly from 1991 to 1993 to 2006–2008. However, pubertal onset and LH levels were no longer significantly different between study periods after adjustment for BMI.

Recently, the Puberty Cohort in Denmark (2012–2017) has reported a mean age at Tanner Stage 2 of 11.1 years [25] corresponding to an advance of around half a year compared to the previous Danish cohort [24]. Interestingly, age at pubertal endpoint (Tanner stage 5) was similar. It is important to note that the methods for data collection differed, making the comparison between the two studies difficult: the first study used clinical examination whereas the second one used questionnaires with self-reported information on Tanner stages. Another milestone of male puberty, voice break, has been reported to advance as well. The Puberty Cohort in Denmark (2012–2017) reported an average age of 13.1 years, which is considerably earlier than former studies reporting between 15.5 and 14.0 years in the period 1968 to 2005 [26,27]. Here again however, the evaluation methods differ, rendering comparison difficult to conduct.

As already pointed out in girls, the initial pubertal signs and signs of completion of puberty appear to show divergent secular changes, suggesting heterogeneity in response of pubertal events to modulating factors. As an example, the first 3–10% of boys with evidence of initial pubertal increase in testicular volume (≥ 4 ml) are younger than in the past (reviewed in 4), whereas the final 3–10% (centile 90 and 97) appear to attain adult testicular volume (≥ 15 ml) later (reviewed in 4).

Is prevalence of precocious puberty increasing?

Data regarding the prevalence of precocious puberty and the existence of a secular trend is very scarce. In 2005, an epidemiological study based on national registries in Denmark estimated that 0.2% of Danish girls and <0.05% of Danish boys had some form of precocious pubertal development [28], which was much higher than data from 40 years ago [29]. However, the overall prevalence could be overestimated because precocious pubertal development included patients with true central precocious puberty as well as patients with premature adrenarche and premature thelarche. Moreover, the age limit of 8 years and 9 years for diagnosis of sexual precocity in girls and boys respectively was extended to 9 and 10 years. Several years later, another study in Denmark found an increase in the number of girls referred for early pubertal development between 1993 and 2009 [30]. In this cohort of 449 Caucasian girls, 88 girls (19.6%) were diagnosed with central precocious puberty (breast development before 8 years and LH peak in the LHRH test > 5 U/L or LH/FSH ratio > 0.66 or basal LH > 0.3 U/L) and only six with peripheral precocious puberty. It follows that more than 50% of the girls referred for advance of pubertal development had no true precocious puberty but conditions that need only a follow up without treatment (Tanner Breast 2 between 8 and 9 years, premature thelarche or premature adrenarche). Another report from tertiary care centers with pediatric endocrinology in Spain estimated a lower incidence compared with Danish data since the prevalence for girls was 0.037% and <0.0005% for boys [31].

European data seem to be consistent with observations in other part of the world such as in Korea. In an epidemiologic study using a national registry, the annual incidence of central precocious puberty increased steeply, in particular, among girls between 2004 and 2010 [32].

Interestingly, this increase in central precocious puberty appears to be more marked in girls than boys [31–33] which could suggest a greater sensitivity of female subjects to environmental factors.

Pubertal timing and EDC exposure in humans

Except in conditions such as industrial spills resulting in accidentally high exposure of a given population to a given EDC, demonstrating the effects of endocrine disruptors on pubertal timing in human conditions remains difficult for several reasons. Girls and boys entering puberty are exposed to low doses of hundreds of chemicals, rendering causation difficult to demonstrate. The exposure may have taken place during the prenatal or the early postnatal period leading to a long latency between exposure and the potential consequences on pubertal timing. Moreover, the effects of exposure to

endocrine disruptors can differ depending on the studied endpoint (i.e. breast development or menarche).

The possible involvement of early life exposure to endocrine disruptors on pubertal timing has been suggested by the observation that the risk of sexual precocity was 80 times higher in children migrating to Belgium for international adoption compared to Belgian native children. Those children had been formerly exposed to the estrogenic insecticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in the country of origin [34]. Vasiliu et al. [35] have also reported early menarche after presumable prenatal/early postnatal exposure to dichlorodiphenyldichloroethylene; a metabolite of DDT. In Denmark, similar findings have been reported in the daughters of women exposed to pesticides due to occupation in green houses [36]. Prenatal exposure to pesticides very early during gestation was associated with earlier breast development in girls. This association appeared not to be caused by changes in gonadotropins, but rather to higher androgen levels, which indirectly may increase oestrogens through aromatization. Studies focusing on the effects of soy-based infant formula on pubertal development have led to mixed results. Most studies are retrospective and limited in term of participants. Some studies have reported that age at menarche appeared to be earlier in girls fed with soy products during infancy [37,38]. In a contemporary British cohort, *in utero* exposure to phytoestrogens was associated with changes in age at menarche with opposite effects depending on the measured phytoestrogen [39]. Prenatal exposure to flame retardants such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) has been associated with later age at menarche [40] while the National Health and Examination Survey (NHANES) showed that higher serum PBDE concentrations between ages 6 and 8 years [41] or 12 and 19 years [42] was associated with slightly earlier menarche or older age at onset of breast development respectively, illustrating once more the potential importance of the window of exposure and sensitivity.

Data about effects of early exposure to endocrine disruptors on pubertal timing in boys are sparse and sometimes contradictory. In 2005, Hsu and colleagues reported a decrease of testosterone levels and increase in FSH levels in chinese boys of mother accidentally exposed to high doses of polychlorinated biphenyls/polychlorodibenzofuranes by ingestion of rice oil contaminated by those compounds [43]. In a birth cohort from the Faroe Islands, prenatal exposure to PCB was associated with lower serum concentration of LH and testosterone [44]. However, only the neonatal levels were predictive of slightly smaller testes [44]. Those results were similar to those described by Eskenazi and colleague [45] in the CHAMOCOS cohort: lower LH and testosterone values were observed in boys of mothers with higher maternal DDT levels. Concomitantly lower LH and testosterone levels in serum suggested a central origin of delayed puberty.

Mechanisms of changes in pubertal timing caused by EDCs

The secular trend in age at onset of puberty as well the possible increased incidence in central precocious puberty in girls suggest a role for environmental factors, EDCs in particular. However, these epidemiological findings in humans face limits as far as clarification about which chemical is involved, which age window is critical, and where the mechanisms take place in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Therefore, human studies need to be complemented by studies using animal models.

It appears that the programming of pubertal maturation is an adaptive mechanism responding to environmental factors very early on. In primate and ovine species, pubertal timing is sexually dimorphic, and sex steroids play a crucial role in gender differences in pubertal timing. Thus it appears logical that early alteration of sex steroid action could affect the programming of puberty timing. The effects of environmental changes or stressors on pubertal timing depend on the period of occurrence or exposure. For instance, prepubertal underfeeding leads to delayed puberty; overfeeding and excess of adiposity in humans may lead to early puberty, whereas intrauterine growth restriction is associated with early puberty (reviewed in 4). What do rodent models teach us regarding critical periods of sensitivity to EDCs? In female rats, for instance, the effect of bisphenol A on pubertal onset appears to depend on the timing of exposure. Vaginal opening is unchanged after gestational exposure, whereas early postnatal exposure is followed by early puberty [46]. Exposure of male rodents to EDCs such as DDE [47], vinclozolin [47] or diethylstilbestrol [47,48] leads to delayed puberty after postnatal exposure (postweaning) as opposed to absence of effects after prenatal exposure (reviewed in 4). The

developmental variations in rodents' sensitivity to EDCs, however, cannot be strictly extrapolated to the critical periods in humans on the account of possible differences between species.

The interpretation of the mechanisms of action of environmental factors is complex due to the multiple sites where they can interact between the hypothalamus and the peripheral target tissues. Abnormal pubertal development caused by EDCs may result from alterations taking place at different levels: the hypothalamic GnRH network, the gonadotropic cells or the gonads themselves (Fig. 1). The physiological acceleration of GnRH secretion before puberty in rat hypothalamic explants can be used to study the effects of environmental factors on the hypothalamic control of puberty [49–52]. In order to model early exposure of migrant children to the pesticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), neonatal female rats were exposed to DDT from postnatal day 6–10. Such exposure led to advanced acceleration of pulsatile GnRH secretion and early onset of puberty [53]. The effect involved estrogen receptors, the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) and a subtype of glutamate receptor [54,55]. Using the same model, we showed that neonatal exposure to an environmentally relevant dose of BPA (25 ng/kg/d) for 15 days was followed by a delay in developmental reduction of GnRH interpulse interval studied *ex vivo* on postnatal day 20. In contrast, exposure to BPA 5 mg/kg/d for 15 days resulted in a premature reduction in GnRH interpulse interval and a trend toward early vaginal opening [56]. Notably, the very low and environmentally relevant dose of BPA delayed neuroendocrine maturation related to puberty through increased inhibitory GABAergic neurotransmission [56]. Recent studies have shown that other members of the GnRH network could be targeted (Fig. 1). The ontogeny and function of kisspeptin neurons are profoundly influenced by gonadal steroids and vulnerable to endocrine disruption [57]. In addition, alterations of sensitivity to sex steroids in sexual dimorphic regions of the hypothalamus can have long-lasting consequences on the control of puberty and reproduction. It has been shown that EDC can affect the expression of estrogen receptors and alter the sensitivity of specific brain regions to endogenous estrogens [58] or polybrominated diphenyl ether-99 [59] and, by consequence, may alter GnRH secretion. EDCs can also interfere with the physiological (prominently inhibitory) feedback mechanisms of sex steroids in hypothalamic-pituitary function, while they can also act as a primer of neuroendocrine maturation [55]. Finally, they can interfere with hormones at the level of peripheral target tissues. Breast development could result from estrogenic EDC effects independent of the hypothalamic-pituitary maturation. This dissociation of effects on breast development and menarche could account for the secular reduction in the correlation coefficient between the ages at occurrence of the two pubertal events reported by some authors [60].

Recent data has shown that female puberty is controlled by epigenetic mechanisms such as histone modifications, DNA methylation and non-coding RNA [61]. Environmental factors such as EDCs affect epigenetic regulation in several tissues but studies identifying how epigenetic pathways convey information from EDCs to hypothalamic neurons regulating the onset of puberty are still required.

Summary

Recent data have shown a persistent secular trend toward early pubertal onset in girls and boys. Detailed analysis actually reveals that the pattern of age distribution is affected. Current variations in pubertal timing involve a trend towards negative or positive distortion for initial or final pubertal stages, respectively, both in girls and boys. This suggests some heterogeneity in response of pubertal events to modulating factors. Those subtle changes are important in clinical practice since the extreme lower and upper age limits in the normal population are used to define early or late maturation. Relatively scarce data suggest that the incidence of central precocious puberty is increasing as well. This trends appears more marked in girls, which again suggest a sexual difference in sensitivity to environmental factors.

The changes taking place in the borderline physiological timing of puberty can be of clinical relevance due to behavioral consequences. Early puberty has been shown to be associated with more frequent adolescent risk taking behaviors and with psychopathologies persisting throughout adult life [62–65]. These issues may account for a significant impact on both the clinician and the society. In addition, altered puberty timing can be a marker of subsequent reproduction abnormalities later in life. In the long term, early and precocious timing of puberty also predict a slight but significant increase in the risk of breast cancer [66], angina, hypertension and type 2 diabetes [67].

TARGETS OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS

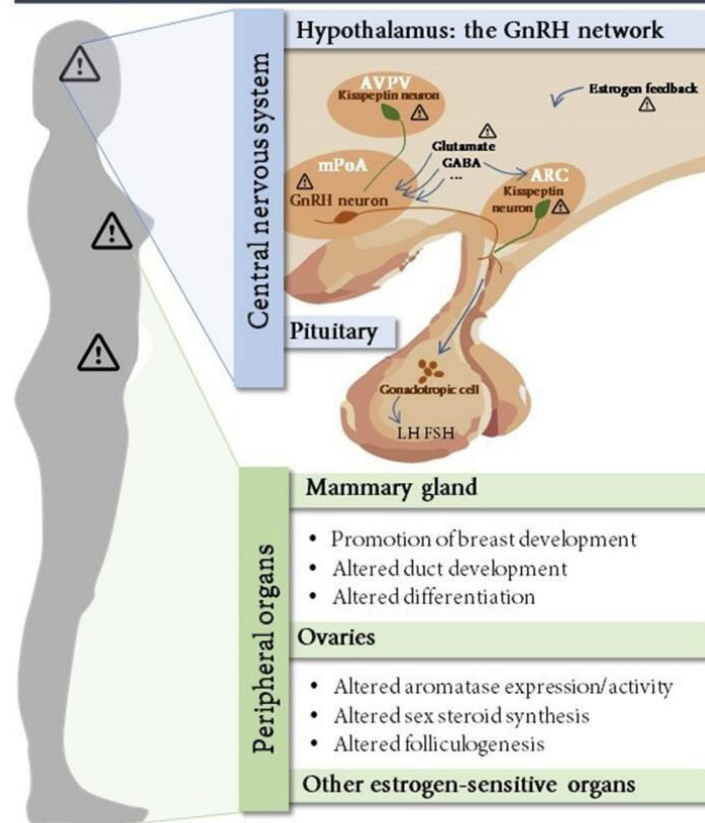


Fig. 1. Schematic representation of EDC targets potentially involved in alterations of pubertal development. Abnormal pubertal development caused by EDCs may result from disruption taking place at different levels: the hypothalamic GnRH network, the gonadotropin cells, the gonads themselves or the mammary gland. Δ represent the potential targets of EDCs as identified by animal studies.

Epidemiological and animal studies have shown that the programming of puberty and reproduction is very sensitive to exposure to EDCs. Both hypothalamic and gonadal targets have been identified. However, the Organisation for Economic Co-operation and Development currently recommends to use the postnatal days 22–42 as validated exposure period for EDC testing. Those guidelines ignore the earlier period that is critical for neuroendocrine maturation, particularly the developmental acceleration of pulsatile GnRH secretion and miss the concept that pubertal timing can be influenced long before the period immediately preceding the onset of puberty. Moreover, in recent years it has been shown that female puberty is controlled by epigenetic mechanism as histone modifications, DNA

methylation and non-coding RNA. Epigenetic repression and activation of gene transcription is a core mechanism by which epigenetics regulates pubertal development. EDCs can affect epigenetic regulation in several tissues and may convey information from a wide range of stimuli to hypothalamic neurons regulating the onset of puberty.

Practitioners can play an important role in both collecting and providing information about the potential burden of EDCs. They should be involved in the promotion of a consumer behavior reducing that burden because puberty is only one among several health issues related to EDCs such as abnormal sexual differentiation, neurodevelopmental diseases, metabolic syndrome and increased risk of neoplasia.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Practice points

- Age distribution of pubertal signs points to a skewed distribution towards earliness for initial pubertal stages and towards lateness for final pubertal stages. It is thus very important to take both the beginning and end of puberty into account when evaluating secular trend in pubertal timing.
- Recent data indicate an increased incidence of central precocious puberty but this data requires larger epidemiological studies.
- Measurement of EDC exposure in individual patient with precocious puberty cannot be interpreted reliably. However, the practitioner can play an important role in collecting data regarding the potential burden of EDCs or the documentation of an epidemics of abnormal puberty in a given region.
- The clinician can play an important role in the promotion of a consumer behavior reducing EDC burden in the pregnant woman and child.

Research agenda

- The effects of EDC mixtures on the control of puberty and reproduction need to be explored further.
- Recent data indicate that EDCs can affect puberty and reproduction transgenerationally. These concerning effects need to be investigated.
- Potential changes in central precocious puberty (especially in girls) incidence need to be documented.

Acknowledgements

This project has been supported by the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium), the Belgian Society for Pediatric Endocrinology and Diabetology and the "Fonds Léon Frédéricq".

References

- [1] Tanner JM. Growth at adolescence; with a general consideration of the effects of hereditary and environmental factors upon growth and maturation from birth to maturity. 2nd ed. 1962. p. 325. Springfield, Ill.
- *[2] Parent AS, Teilmann G, Juul A, et al. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 2003;24(5):668–93.

- [3] Frisch RE, Revelle R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* 1970;169:397–9.
- *[4] Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, et al. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol* 2015;38:12–36.
- [5] Mac Mahon B. Age at menarche, United States. DHEW Pub. no. (HRA) 74-1615. National Health Survey; 1973. p. 133.
- [6] Tanner JM, Davies PSW. Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. *J Pediatr* 1985;107:317–29.
- *[7] Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, et al. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. *Pediatrics* 1997;99(4):505–12.
- *[8] Biro FM, Pajak A, Wolff MS, et al. Age of Menarche in a longitudinal US cohort. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2018;31(4):339–45.
- *[9] Aksglaede L, Sørensen K, Petersen JH, et al. Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. *Pediatrics* 2009;123(5):932–9.
- [10] Pathak PK, Tripathi N, Subramanian SV. Secular trends in menarcheal age in India—evidence from the Indian human development survey. *PLoS One* 2014;9(11):e111027.
- [11] Meng X, Li S, Duan W, et al. Secular trend of age at menarche in Chinese adolescents born from 1973 to 2004. *Pediatrics* 2017 Aug;140(2).
- [12] Sun SS, Schubert CM, Chumlea WC, et al. National estimates of the timing of sexual maturation and racial differences among US children. *Pediatrics* 2002;110:911–9.
- [13] Euling SY, Herman-Giddens ME, Lee PA, et al. Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. *Pediatrics* 2008;121(Suppl. 3):172–91.
- *[14] Biro FM, Greenspan LC, Galvez MP, et al. Onset of breast development in a longitudinal cohort. *Pediatrics* 2013;132(6):1019–27.
- [15] Papadimitriou A, Pantiotou S, Douros K, et al. Timing of pubertal onset in girls: evidence for non-Gaussian distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):4422–5.
- [16] Woelfle J, Lindberg A, Aydin F, et al. Secular trends on birth parameters, growth, and pubertal timing in girls with Turner syndrome. *Front Endocrinol* 2018;9:54.
- [17] Lebrethon MC, Aganina A, Fournier M, et al. Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol* 2007;19:181–8.
- [18] Aksglaede L, Juul A, Olsen LW, et al. Age at puberty and the emerging obesity epidemic. *PLoS One* 2009;4(12):e8450.
- [19] Herman-Giddens ME, Wang L, Koch G. Secondary sexual characteristics in boys: estimates from the national health and nutrition examination survey III, 1988–1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:1022–8.
- [20] Karpati AM, Rubin CH, Kieszak SM, et al. Stature and pubertal stage assessment in American boys: the 1988–1994 third national health and nutrition examination survey. *J Adolesc Health* 2002;30:205–12.
- [21] Harlan WR, Grillo GP, Cornoni-Huntley J, et al. Secondary sex characteristics of boys 12 to 17 years of age: the U.S. Health Examination Survey. *J Pediatr* 1979;95:293–7.
- [22] Mul D, Fredriks AM, van Buuren S, et al. Pubertal development in The Netherlands 1965–1997. *Pediatr Res* 2001;50:479–86.
- *[23] Juul A, Teilmann G, Scheike T, et al. Pubertal development in Danish children: comparison of recent European and US data. *Int J Androl* 2006;29:247–55.
- [24] Sørensen K1, Aksglaede L, Petersen JH, et al. Recent changes in pubertal timing in healthy Danish boys: associations with body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(1):263–70.
- [25] Brix N, Ernst A, Lauridsen LLB, et al. Timing of puberty in boys and girls: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2019;33(1):70–8.
- [26] Andersen E. Skeletal maturation of Danish school children in relation to height, sexual development, and social conditions. *Acta Paediatr Scand* 1968;57(Suppl. 185):97–101.
- [27] Juul A, Magnusdottir S, Scheike T, et al. Age at voice break in Danish boys: effects of pre-pubertal body mass index and secular trend. *Int J Androl* 2007;30:537–42.
- [28] Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, et al. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. *Pediatrics* 2005;116(6):1323–81.
- [29] Thamdrup E. Precocious sexual development: a clinical study of one hundred children. *Dan Med Bull* 1961;8:140–2.
- [30] Mogensen SS, Aksglaede L, Mouritsen A, et al. Diagnostic work-up of 449 consecutive girls who were referred to be evaluated for precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(5):1393–401.
- [31] Soriano-Guillen L, Corripio R, Labarta JL, et al. Central precocious puberty in children living in Spain: incidence, prevalence, and influence of adoption and immigration. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(9):4305–13.
- [32] Kim SH, Huh K, Won S, et al. A significant increase in the incidence of central precocious puberty among Korean girls from 2004 to 2010. *PLoS One* 2015;10(11):e0141844.
- [33] Topor LS, Bowerman K, Machan JT, et al. Central precocious puberty in Boston boys: a 10-year single center experience. *PLoS One* 2018;13(6):e0199019.
- [34] Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M, et al. Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Hum Reprod* 2001;16(5):1020–6.
- [35] Vasilio O, Muttineni J, Karmaus W. In utero exposure to organochlorines and age at menarche. *Hum Reprod* 2004;19(7):1506–12.
- *[36] Wohlfahrt-Veje C, Andersen HR, Schmidt IM, et al. Early breast development in girls after prenatal exposure to non-persistent pesticides. *Int J Androl* 2012;35:273–82.
- [37] Adgent M, Daniels J, Rogan W, et al. Early-life soy exposure and age at menarche. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26(2):163–75.

- [38] Strom BL, Schinnar R, Ziegler EE, et al. Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *J Am Assoc* 2001;286(7):807–14.
- [39] Marks KJ, Hartman TJ, Taylor EV, et al. Exposure to phytoestrogens in utero and age at menarche in a contemporary British cohort. *Environ Res* 2017;155:287–93.
- [40] Harley KG, Rauch SA, Chevrier J, et al. Association of prenatal and childhood PBDE exposure with timing of puberty in boys and girls. *Environ Int* 2017;100:132–8.
- [41] Windham GC, Pinney SM, Voss RW, et al. Brominated flame retardants and other persistent organohalogenated compounds in relation to timing of puberty in a longitudinal study of girls. *Environ Health Perspect* 2015;123(10):1046–52.
- [42] Chen A, Chung E, DeFranco EA, et al. Serum PBDEs and age at menarche in adolescent girls: analysis of the national health and nutrition examination survey 2003–2004. *Environ Res* 2011;111(6):831–7.
- [43] Hsu PC, Lai TJ, Guo NW, et al. Serum hormones in boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *J Toxicol Environ Health* 2005;68:1447–56.
- [44] Grandjean P, Grønlund C, Kjær IM, et al. Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reprod Toxicol* 2012;34(4):498–503.
- [45] Eskenazi B, Rauch SA, Tenerelli R, et al. In utero and childhood DDT, DDE, PBDE and PCBs exposure and sex hormones in adolescent boys : the CHAMACOS study. *Int J Hyg Environ Health* 2017;220:364–72.
- [46] Bourguignon JP, Franssen D, Gerard A, et al. Early neuroendocrine disruption in hypothalamus and hippocampus: developmental effects including female sexual maturation and implications for endocrine disrupting chemical screening. *J Neuroendocrinol* 2013;25:1079–87.
- [47] Yoshimura S, Konno K, Ohsawa N, et al. Observation of prepubertal separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. *J Toxicol Pathol* 2005;18:141–57.
- [48] Odum J, Lefevre PA, Tinwell H, et al. Comparison of the developmental and reproductive toxicity of diethylstilbestrol administered to rats in utero, lactationally, preweaning, or postweaning. *Toxicol Sci* 2002;68:147–63.
- [49] Bourguignon JP, Gerard A, Franchimont P. Maturation of the hypothalamic control of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion at onset of puberty: II. Reduced potency of an inhibitory autorefeedback. *Endocrinology* 1990;127(6):2884–90.
- [50] Bourguignon JP, Gerard A, Mathieu J, et al. Maturation of the hypothalamic control of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion at onset of puberty. I. Increased activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Endocrinology* 1990;127(2):873–81.
- [51] Bourguignon JP, Franchimont P. Puberty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology* 1984;114(5):1941–3.
- [52] Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, et al. Neuroendocrine mechanism of onset of puberty. Sequential reduction in activity of inhibitory and facilitatory N-methyl-D-aspartate receptors. *J Clin Invest* 1992;90(5):1736–44.
- [53] Rasier G, Parent AS, Gerard A, et al. Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* 2007;77(4):734–42.
- [54] Rasier G, Parent AS, Gerard A, et al. Mechanisms of interaction of endocrine-disrupting chemicals with glutamate-evoked secretion of gonadotropin-releasing hormone. *Toxicol Sci* 2008;102(1):33–41.
- [55] Rasier G, Toppari J, Parent AS, et al. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254–255:187–201.
- [56] Franssen D, Gérard A, Hennuy B, et al. Delayed neuroendocrine sexual maturation in female rats after a very low dose of bisphenol a through altered GABAergic neurotransmission and opposing effects of a high dose. *Endocrinology* 2016;157(5):1740–50.
- [57] Patisaul HB. Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the Kisspeptin System. In: Kauffman AS, Smith JT, editors. *Advances in experimental medicine and biology*. Springer; 2013. p. 455–79.
- [58] Maerkel K, Durrer S, Henseler M, et al. Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disruptors: developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;218(2):152–65.
- [59] Faass O, Ceccatelli R, Schlumpf M, et al. Developmental effects of perinatal exposure to PBDE and PCB on gene expression in sexually dimorphic rat brain regions and female sexual behavior. *Gen Comp Endocrinol* 2013;188:232–41.
- [60] Biro FM, Huang B, Crawford PB, et al. Pubertal correlates in black and white girls. *J Pediatr* 2006;148(2):234–40.
- [61] Lomniczi A, Wright H, Ojeda SR. Epigenetic regulation of female puberty. *Front Neuroendocrinol* 2015;36:90–107.
- [62] Stattin H, Kerr M, Skoog T. Early pubertal timing and girls' problem behavior: integrating two hypotheses. *J Youth Adolesc* 2011;40:1271–87.
- [63] Petersen AC. Adolescent development. *Annu Rev Psychol* 1988;39:583–607.
- [64] Patton GC, McMorris BJ, Toumbourou JW, et al. Puberty and the onset of substance use and abuse. *Pediatrics* 2004;114(3):300–6.
- [65] Mendle J, Ryan RM, McKone KMP. Age at menarche, depression, and antisocial behavior in adulthood. *Pediatrics* 2018;141(1):e20171703.
- [66] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118,964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 2012;13:1141–51.
- [67] Day FR, Elks CE, Murray A, et al. Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Sci Rep* 2015;5:11208.

