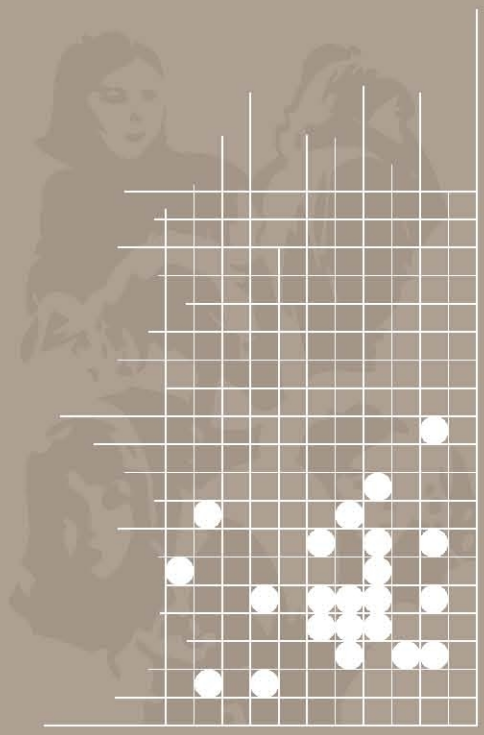


Reproduction et environnement

Expertise collective

Instituts thématiques

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Reproduction et environnement

Reproduction et environnement

ISBN 978-2-85598-890-X

© Les éditions Inserm, 2011 101 rue de Tolbiac, 75013 Paris

Dans la même collection

- Éducation pour la santé des jeunes. Démarches et méthodes. 2001
- Alcool. Effets sur la santé. 2001
- Cannabis. Quels effets sur le comportement et la santé ? 2001
- Asthme. Dépistage et prévention chez l'enfant. 2002
- Déficits visuels. Dépistage et prise en charge chez le jeune enfant. 2002
- Troubles mentaux. Dépistage et prévention chez l'enfant et l'adolescent. 2002
- Alcool. Dommages sociaux, abus et dépendance. 2003
- Hépatite C. Transmission nosocomiale. État de santé et devenir des personnes atteintes. 2003
- Santé des enfants et des adolescents, propositions pour la préserver. Expertise opérationnelle. 2003
- Tabagisme. Prise en charge chez les étudiants. 2003
- Tabac. Comprendre la dépendance pour agir. 2004
- Psychothérapie. Trois approches évaluées. 2004
- Déficiences et handicaps d'origine périnatale. Dépistage et prise en charge. 2004
- Tuberculose. Place de la vaccination dans la maladie. 2004
- Suicide. Autopsie psychologique, outil de recherche en prévention. 2005
- Cancer. Approche méthodologique du lien avec l'environnement. 2005
- Trouble des conduites chez l'enfant et l'adolescent. 2005
- Cancers. Pronostics à long terme. 2006
- Éthers de glycol. Nouvelles données toxicologiques. 2006
- Déficits auditifs. Recherches émergentes et applications chez l'enfant. 2006
- Obésité. Bilan et évaluation des programmes de prévention et de prise en charge. 2006
- La voix. Ses troubles chez les enseignants. 2006
- Dyslexie, dysorthographie, dyscalculie. Bilan des données scientifiques. 2007
- Maladie d'Alzheimer. Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux. 2007
- Croissance et puberté. Évolutions séculaires, facteurs environnementaux et génétiques. 2007
- Activité physique. Contextes et effets sur la santé. 2008
- Autopsie psychologique. Mise en œuvre et démarches associées. 2008
- Saturnisme. Quelles stratégies de dépistage chez l'enfant. 2008
- Jeux de hasard et d'argent. Contextes et addictions. 2008
- Cancer et environnement. 2008
- Tests génétiques. Questions scientifiques, médicales et sociétales. 2008
- Santé de l'enfant. Propositions pour un meilleur suivi. 2009
- Transplantation d'organes. Quelles voies de recherche ? 2009
- Santé des enfants et des adolescents. Propositions pour la préserver. 2009
- Réduction des risques infectieux chez les usagers de drogues. 2010
- Téléphone et sécurité routière. 2011
- Stress au travail et santé. Situation chez les indépendants. 2011

DANGER LE PHOTOCOPILLAGE TUE LE LIVRE

Ce logo rappelle que le code de la propriété intellectuelle du 1er juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants-droits.
Le non-respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique.

Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20 rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).

Couverture: conception graphique © Frédérique Koulikoff, DISC Inserm

Reproduction et environnement

Expertise collective

Instituts thématiques

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Cet ouvrage présente les travaux du groupe d'experts réunis par l'Inserm dans le cadre de la procédure d'expertise collective (annexe 1), pour répondre à la demande du ministère de la Santé concernant les substances chimiques accessibles au grand public et leurs effets sur la reproduction.

Ce travail s'appuie sur les données scientifiques disponibles en date du second semestre 2010. Près de 1 700 articles ont constitué la base documentaire de cette expertise.

Le Centre d'expertise collective de l'Inserm, rattaché à l'Institut thématique multi-organismes Santé publique, a assuré la coordination de cette expertise collective.

Groupe d'experts et auteurs

Carlo ADAMO, École nationale supérieure de chimie de Paris (ENSCP), Chimie ParisTech, Paris

Jean-Philippe ANTIGNAC, Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (Laberca), USC Inra 2013, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (ONIRIS), Nantes

Jacques AUGER, Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction, CECOS, Hôpital Cochin, Université Paris V, Paris

Patrick BALAGUER, Équipe Signalisation hormonale, environnement et cancer, Inserm U 896, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, Montpellier

Deborah BOURC'HIS, Équipe Décisions épigénétiques et reproduction chez les mammifères, Unité de génétique et biologie du développement CNRS UMR 3215-Inserm U 934, Institut Curie, Paris

Louis BUJAN, Groupe de recherche en fertilité humaine, Équipe d'accueil 3694, Université Paul Sabatier Toulouse III et CECOS, Hôpital Paule de Viguier, CHU Toulouse

Cécile CHEVRIER, Groupe d'étude de la reproduction chez l'homme et les mammifères, Inserm U 625, Université Rennes 1

Corinne COTINOT, Différenciation gonadique et ses perturbations, Unité de biologie du développement et reproduction Inra/ENVA, UMR 1198, Jouy-en-Josas

Jean-Pierre CRAVEDI, Toxicologie alimentaire, UMR 1331 Inra/INP/UPS ToxAlim, Inra, Toulouse

Vincent LAUDET, Équipe de zoologie moléculaire, Institut de génomique fonctionnelle de Lyon, UMR 5242 CNRS, École Normale Supérieure de Lyon, Inra, Université Claude Bernard Lyon 1

Gabriel LIVERA, Unité mixte de recherche sur cellules souches et radiations, Inserm U 967, CEA, Université Paris VII, Fontenay-aux-Roses

Rémy SLAMA, Épidémiologie environnementale appliquée à la reproduction et la santé respiratoire, Inserm U 823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble

Ont présenté une communication

Claire BEAUSOLEIL, Unité Toxicologie / Direction Santé Environnement Travail, Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), Maisons-Alfort

Jean-Pierre BOURGUIGNON, Laboratoire de Neuroendocrinologie développementale, Département de Pédiatrie et Centre de Recherche en Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CHU Sart Tilman, Liège, Belgique

Coordination scientifique, éditoriale, bibliographique et logistique

Fabienne BONNIN, attachée scientifique, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Catherine CHENU, attachée scientifique, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Jeanne ETIEMBLE, directrice de recherche émérite, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Cécile GOMIS, secrétaire, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Marie-Thérèse LABRO, chargée d'expertise, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Marie-Christine LECOMTE, directrice, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Anne-Laure PELLIER, attachée scientifique, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Chantal RONDET-GRELLIER, documentaliste, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris

Iconographie

Jean-Pierre LAIGNEAU, Inserm

Préface

La remarquable expertise collective réalisée sur les perturbateurs endocriniens (PE), sous l'égide de l'Inserm, apparaît comme la synthèse actuelle la plus exhaustive de connaissances dans le domaine. Elle dresse un état des lieux analytique et critique qui, sans nul doute, alimentera le débat et aidera à la prise de décisions dans un domaine très sensible comme l'actualité le rappelle régulièrement.

Les cinq substances ou familles de substances chimiques (bisphénol A, phtalates, retardateurs de flamme, composés perfluorés, parabènes) analysées dans cette expertise collective sont présentes dans l'environnement des populations occidentales depuis déjà plusieurs décennies. On les retrouve dans les liquides biologiques (sang, urine, liquide amniotique, lait maternel…) et les tissus chez l'homme, la femme, l'enfant et même le fœtus. En tant que perturbateurs endocriniens, leurs effets potentiels sur les organes et la fonction de la reproduction humaine sont une préoccupation légitimement soulevée par les pouvoirs publics. Les effets rapportés parfois chez l'homme, le plus souvent dans les études expérimentales chez l'animal, sont difficilement reliés aux mécanismes d'action actuellement connus. Le constat s'impose donc : les perturbateurs endocriniens mettent en jeu les mécanismes de signalisation, de régulation et d'action physiologiques plutôt que les mécanismes classiques de la toxicité conduisant au dysfonctionnement ou à la mort cellulaire. Leur étude nécessite de se pencher sur la complexité des régulations endocriniennes et des mécanismes du développement, en particulier lors de phases critiques du développement, durant la vie embryonnaire et fœtale.

L'un des enseignements important de l'expertise collective est que l'émergence de la problématique de la perturbation endocrinienne consacre le retour à une vision intégrative du vivant, c'est-à-dire la prise en compte de la complexité physiologique et environnementale. La toxicologie renoue ainsi avec ses origines puisque certains des scientifiques qui ont bâti la biologie moderne et la toxicologie expérimentale au XIXe siècle étaient aussi d'éminents physiologistes tels Claude Bernard et François Magendie. Depuis, l'anatomo-pathologie, diverses méthodes analytiques, l'étude de la génotoxicité, plus récemment la biologie moléculaire et cellulaire, et les approches multivariées ont considérablement enrichi le domaine de la toxicologie expérimentale et de l'épidémiologie.

La préface de cet ouvrage nous permet d'aborder les prémices d'une nouvelle démarche scientifique pour l'étude des perturbateurs endocriniens qui tiendrait compte de la situation réelle d'exposition des populations à un ensemble de substances chimiques ayant potentiellement les mêmes cibles.

Traditionnellement, l'approche toxicologique vise à évaluer des effets potentiels d'une molécule donnée sur différents systèmes biologiques *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Outre la complexité intrinsèque du concept de perturbation endocrinienne, un degré supplémentaire dans cette complexité apparaît avec la notion de mélanges, c'est-à-dire de cocktails de substances toxiques pouvant avoir, tant au niveau de la cellule qu'au niveau de l'organisme, voire des populations et des écosystèmes, des effets additifs ou synergiques selon Hass et coll. (2007) et Christiansen et coll. (2009), ou encore des effets décrits comme « *something from nothing* » par Kortenkamp (2007, 2008).

Cette situation invite la toxicologie à approfondir ses approches, l'« expologie » (chimie analytique) à développer ses technologies et l'épidémiologie à prendre en compte les expositions concomitantes multiples dans les modèles de causalité, en les considérant de façon combinée et non pas isolée comme ceci est habituel dans les études de chaînes de causalité. Les concepts de « multicausalité » et de réseaux de causes doivent dorénavant être mobilisés.

Les organismes vivants sont toujours exposés à une multitude de composés de l'environnement présentant un caractère toxique. Ces composés interagissent entre eux ; leurs effets sont également sous la dépendance de caractéristiques des individus (leur génotype par exemple) et d'autres expositions comportementales et environnementales. Le grand défi des décennies à venir est de pouvoir décrypter la composition et les actions de ces mélanges et d'identifier les molécules les plus toxiques ainsi que les différents types d'interactions de leurs effets. Il s'agit bien là d'un véritable problème de santé publique visant à rapprocher du monde réel toxicologues, biologistes, épidémiologistes et à fournir des outils d'intervention.

Dans les réflexions internationales, la prise en compte de la notion de mélange a conduit à développer récemment le concept « d'exposome ». Ainsi à l'avenir, chaque individu pourra accéder à sa « carte d'identité d'exposition » de sa naissance à l'âge adulte grâce aux technologies de l'« exposomique », tout comme il pourra disposer de sa « carte d'identité génétique » grâce à celles de la génomique.

En pratique, la question des mélanges s'adresse autant aux décideurs publics qu'aux chercheurs. Prenons un exemple très simple : considérons qu'un aliment est contaminé par une dizaine de PE aux cibles identiques et aux modes d'action semblables. Admettons également que l'exposition à chacun de ces PE soit juste en dessous de la valeur limite tolérable. Rappelons que ces valeurs limites sont calculées pour chacun des composés. Si la mesure de l'exposition pour ce composé est en dessous du seuil déterminé, l'exposition est admise comme « sans danger » et l'aliment peut être consommé sans crainte apparente. Si les dix PE sont chacun en dessous des seuils, chacun d'entre eux est considéré sans effet et l'ensemble sans danger (dix fois rien, c'est toujours rien !). Cependant, il existe une toute autre approche. En

supposant que le mode d'action des dix PE est semblable, il est possible de calculer une dose équivalente tenant compte de la dose réelle de chaque PE et de son « efficacité » à provoquer l'effet toxique. En faisant la somme des doses équivalentes des PE du mélange initial, les valeurs seuils seront largement dépassées et l'aliment ne pourra plus être considéré comme réellement sain. Dans cette approche, c'est l'additivité des doses équivalentes qui est prise en compte. Plusieurs travaux récents sur divers PE soulignent la pertinence de ce type de raisonnement (Kortenkamp, 2007, 2008). En outre, la manifestation éventuelle de ces effets dépendra des caractéristiques des individus exposés, de leur propre sensibilité aux substances considérées et de leurs autres facteurs de risque.

Nous sommes bel et bien entrés de façon irréversible dans des démarches intégratives qui sont les seules à même de garantir les progrès importants attendus par la société au niveau de l'interface Santé-Environnement.

Il existe un précédent fameux pour la notion de dose équivalente, puisqu'il s'agit des dioxines et des composés « *dioxine-like* » comme les furanes et certains PCB. Dans ce cas, on savait qu'il fallait additionner les doses équivalentes (Teq)[1], d'où la mise en place d'une réglementation. Il semble logique pour les PE ayant les mêmes mécanismes, que l'on soit conduit à raisonner en termes de doses équivalentes. Toutefois, des travaux plus fondamentaux montrent que pour les dioxines, ces notions doivent être encore modulées, la nature du toxique ne dictant pas seulement son efficacité, mais pouvant également modifier qualitativement le type d'effet final, même lorsque ces toxiques affectent un récepteur identique.

Les effets combinés les plus difficiles à explorer ne sont pas ceux qui concernent les mélanges de produits ayant un même mécanisme d'action, mais bien ceux de produits mettant en jeu des mécanismes différents. Dans ce cas, les effets peuvent théoriquement être simplement additifs, synergiques, voire antagonistes. Certains PE ont vis-à-vis des récepteurs de l'œstradiol des activités de type agoniste, alors que d'autres sont des antagonistes assez efficaces. La résultante n'est pas évidente à déterminer en cas de mélange très complexe. *A contrario*, certains agonistes de l'œstradiol peuvent être associés à des antagonistes des récepteurs des androgènes et dans ce cas, il est possible qu'une potentialisation des effets finaux soit observée. Les mélanges peuvent également avoir des effets plus subtils, par exemple lorsque l'un des toxiques interfère avec le métabolisme ou la cinétique d'un des composés présents ou perturbe les systèmes adaptatifs déclenchés par un autre composé. Les exemples de ce type abondent dans le domaine du médicament, mais s'observent

1. Le système d'« Equivalents Toxiques » (TEQ) exprime la toxicité relative de chaque composé moins toxique en tant que fraction de la toxicité du TCDD le plus toxique. À chaque composé est attribué un « Facteur d'Equivalence Toxique » (ou TEF pour *Toxic Equivalent Factor*). Ce coefficient de pondération indique le degré de toxicité par rapport au 2,3,7,8-TCDD, auquel une valeur de référence de 1 a été donnée.

aussi pour les contaminants (Ambolet-Camoit et coll., 2010). Dans ces situations, les habituels critères de causalité de Bradford Hill (force de l'association, relation dose-effet, spécificité…) sont insuffisants. Il faut les reconsidérer dans une perspective de multicausalité ou de réseaux de causes. Ainsi, prise isolément, chacune des substances ne pourra pas être tenue pour responsable de la survenue d'effets indésirables, alors que leur mélange le sera. Ces questions de recherche auront des retombées importantes en analyse de risque.

À examiner le degré de complexité que représente l'étude de mélanges de contaminants, on peut ressentir un certain découragement. Comment modéliser l'interaction de cent, de mille polluants ? Une réponse possible est apportée par un programme américain appelé Tox21 qui fait suite au rapport de la *National Academy of Sciences* intitulé « *Toxicity testing in the twenty-first century : a vision and a strategy* »[2]. En résumé, ce programme propose d'identifier des tests simples pour les quelques dizaines de voies de toxicité les plus représentées et, de raisonner sur la ou les voies de toxicité plutôt que sur un produit donné. L'avantage de cette approche est de réduire l'étude de l'ensemble des produits chimiques (plus de cent mille produits) à celle de l'ensemble des voies activées (une vingtaine). Le projet Tox21 vise dans un premier temps, à tester quelques milliers de contaminants et à déterminer les principales voies qui sont activées par ces substances. Après ce travail systématique, il faudra trouver les moyens de modéliser les interactions entre les voies identifiées à partir des connaissances mécanistiques et de l'apport de la biologie systémique, puis tester ces résultats en situation réelle.

La compréhension fine des mécanismes mis en jeu et l'obtention de preuves de causalité formelles chez l'homme représentent un travail considérable, qui ne pourra pas aboutir prochainement. Néanmoins, si ces objectifs demeurent essentiels et prioritaires, cela n'empêche pas d'envisager d'emblée des pistes d'action. En effet, le type de modélisation décrit ci-dessus permet d'identifier des possibilités de blocage potentiel des chaînes de causalité et des interactions, sans la nécessité d'en comprendre l'agencement précis. L'application du principe de précaution devrait être possible à partir du moment où la suspicion fondée sur des données scientifiques impose d'agir pour supprimer ou réduire des effets graves ou irréversibles sur la santé, du fait d'expositions non obligatoires. Même si la complexité scientifique, le degré d'incertitude ou l'ignorance ne permettent pas de comprendre tous les mécanismes d'action, il ne faut pas attendre la preuve de la causalité et la compréhension de ces mécanismes pour protéger la santé des populations et mettre en place la production de substances de substitution. Les décisions à prendre sont difficiles et lourdes de conséquences ; elles doivent être revues en fonction des avancées scientifiques. Une concertation formelle associant toutes les parties

2. http://www.nap.edu/catalog/11970.html

prenantes (comparable par exemple au Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, GIEC) pourrait être entreprise sur ces sujets, pour proposer des décisions collectives, sous les auspices de l'Organisation des Nations Unies (ONU) et/ou de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Robert Barouki, *Inserm UMR-S 747, Université Paris Descartes, IMTCE, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris*

Bernard Jégou, *Inserm U 625, Université Rennes I, Campus de Beaulieu, IFR-140, GERHM, Rennes*

Alfred Spira, *Inserm U 1018, Faculté de médecine, Université Paris Sud / Institut de Recherche en Santé Publique (IReSP), Paris*

Bibliographie

AMBOLET-CAMOIT A, BUI LC, PIERRE S, CHEVALLIER A, MARCHAND A, et coll. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker agr2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicol Sci* 2010, **115** : 501-512

CHRISTIANSEN S, SCHOLZE M, DALGAARD M, VINGGAARD AM, AXELSTAD M, et coll. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environmental Health Perspectives* 2009, **117** : 1839-1846

HASS U, SCHOLZE M, CHRISTIANSEN S, DALGAARD M, VINGGAARD AM, et coll. Combined exposure to ant-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environmental Health Perspectives* 2007, **115** (suppl 1) : 122-128

KORTENKAMP A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 2007, **115** (suppl 1) : 98-105

KORTENKAMP A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *International Journal of Andrology* 2008, **31** : 233-240

Sommaire

Avant-propos XVII

Analyse

I Évolutions temporelles des altérations de la fonction de reproduction humaine 1

Introduction 3

1. Malformations génitales du garçon, hypospadias et cryptorchidie ... 5
2. Qualité du sperme 17
3. Fertilité des couples 31
4. Âge de la puberté 41
5. Cancers du testicule, de la prostate, du sein et de l'ovaire 47
6. Conclusions et perspectives de recherche 67

II Fonction de reproduction et différences entre espèces .. 69

Introduction 71

7. Développement des organes sexuels 73
8. Malformations des voies génitales chez l'homme et la femme 91
9. Puberté 95
10. Fonctionnement des ovaires 99
11. Fonctionnement des testicules 103
12. Modifications épigénétiques 111
13. Conclusions et perspectives de recherche 123

III Effets de xénobiotiques sur la reproduction 127

Introduction 129

14. Toxicocinétique 131
15. Effets et mécanismes d'action 141

16. Conclusions et perspectives de recherche 163

IV Méthodes et outils de caractérisation de l'impact de xénobiotiques sur la reproduction 167

Introduction 169

17. Méthodes d'étude *in vitro* 171

18. Méthodes d'études *in vivo* 179

19. Méthodes d'études *in silico* 187

20. Approches « omiques » 193

21. Méthodes d'étude épidémiologique 201

22. Conclusions et perspectives de recherche 221

V Bisphénol A 225

Introduction 227

23. Exposition des populations 231

24. Études épidémiologiques 245

25. Études chez les animaux mâles 265

26. Études chez les animaux femelles 273

27. Effets cellulaires et tissulaires 285

28. Effets chromosomique, génétique et épigénétique 299

29. Mécanismes d'action 309

30. Relation structure–fonction 319

31. Autres modèles d'études 327

32. Conclusions et perspectives de recherche 337

VI Phtalates 341

Introduction 343

33. Exposition des populations 347

34. Études épidémiologiques 367

35. Études chez les animaux mâles 389

36. Études chez les animaux femelles 417

37. Études sur cultures d'organes et cellulaires 425

38. Études chez les poissons et autres espèces de vertébrés 437

39. Effets épigénétiques 443
40. Mécanismes d'action 447
41. Relation structure-fonction et études *in silico* 455
42. Conclusions et perspectives de recherche 459

VII Retardateurs de flamme polybromés (RFB) 461
Introduction 463
43. Exposition des populations 467
44. Études épidémiologiques 487
45. Études chez l'animal 493
46. Effets cellulaires et tissulaires 505
47. Études chez les poissons et les amphibiens 509
48. Mécanismes d'action 517
49. Conclusions et perspectives de recherche 529

VIII Composés perfluorés (PFC) 533
Introduction 535
50. Exposition des populations 539
51. Études épidémiologiques 557
52. Études chez l'animal 569
53. Études chez les poissons 579
54. Mécanismes d'action 589
55. Conclusions et perspectives de recherche 595

IX Parabènes 599
Introduction 601
56. Exposition des populations 605
57. Études épidémiologiques 615
58. Études chez l'animal 619
59. Mécanismes d'action 629
60. Études structure-fonction, études in silico 633
61. Conclusions et perspectives de recherche 637

Synthèse 641

Communication 681

Annexes 695

Expertise collective Inserm 697

Tableau : Récapitulatif des principales données 703

Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques 705

Avant-propos

De nombreux facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux sont susceptibles d'agir sur la fertilité ou sur le développement de l'appareil reproducteur[1]. L'exposition aux substances chimiques, en particulier aux perturbateurs endocriniens largement présents dans l'environnement, constitue un type de risque qu'il est important d'explorer puisqu'il pourrait être maîtrisé.

La réglementation européenne impose des interdictions et des restrictions de mise sur le marché et d'usage pour le grand public de substances chimiques ayant été reconnues comme reprotoxiques de catégorie 1[2] ou 2[3]. Un certain nombre de substances chimiques qui ne sont ni cancérogènes ni mutagènes sont classées à ce jour comme reprotoxiques de catégorie 3[4]. Pour ces derniers, des effets sur la fonction de reproduction sont possibles mais les preuves sont insuffisantes pour un classement en catégorie 2.

Ces dernières années, des publications issues de différents laboratoires de recherche indépendants ont attiré l'attention sur des effets possibles sur les organes ou la fonction de reproduction, de substances chimiques présentes dans des produits de grande consommation. Des travaux le plus souvent réalisés *in vitro* ou dans différentes espèces animales, parfois des études épidémiologiques, ont constitué des signaux d'alerte pour les pouvoirs publics et les agences sanitaires.

Face aux interrogations de la société sur une possible dangerosité de substances chimiques accessibles au grand public, le ministère de la Santé a sollicité l'Inserm pour une analyse des données disponibles sur les effets de certaines de ces substances sur la reproduction.

Pour répondre à la demande du ministère de la Santé, un groupe pluridisciplinaire d'experts constitué d'épidémiologistes, de chimistes, d'endocrinologues, de biologistes spécialistes de la reproduction, du développement, de génétique moléculaire, a fait le point dans un premier temps sur les connaissances actuelles en épidémiologie, physiologie et biologie de la reproduction ainsi que sur les méthodes d'études de l'impact sanitaire de contaminants de

---

1. Jégou B, Jouannet P, Spira A. La fertilité est-elle en danger ? Éditions La Découverte, Paris, 2009 : 231p
2. Substances connues pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine et/ou pour provoquer des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (phrase de risque : R60 ou R61)
3. Substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité humaine et/ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (phrase de risque : R60 ou R61)
4. Substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine et/ou pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement (phrase de risque : R62 ou R63)

l'environnement. Pour chacune des familles de substances chimiques d'intérêt, l'analyse de la littérature a été structurée, dans un deuxième temps, autour des questions suivantes :

• Quelles sont les principales sources et voies d'exposition de la population générale à la substance d'intérêt ?

• Quelles sont les données sur l'imprégnation des populations selon le sexe, l'âge et d'autres critères ? Peut-on identifier des populations plus exposées ?

• Quelle est la toxicocinétique du composé et de ses métabolites dans l'organisme ?

• Qu'indiquent les études épidémiologiques ayant mis en relation une exposition à la substance d'intérêt et la survenue de troubles de la fonction de reproduction ?

• Quels sont les effets observés dans les études expérimentales réalisées chez les rongeurs, d'autres espèces de mammifères ou encore des espèces réputées sensibles telles que les vertébrés aquatiques, aux doses compatibles avec les niveaux d'exposition chez l'Homme ?

• Quels sont les effets observés chez l'animal selon les périodes d'exposition (période prénatale, néonatale, prépubertaire, post-pubertaire) ? Peut-on définir des périodes critiques d'exposition ?

• Quels sont les effets spécifiquement observés au niveau des tissus de l'appareil reproducteur mâle et femelle dans les études *in vivo* et à partir de culture de cellules (éventuellement humaines) ?

• Quels mécanismes peuvent être évoqués pour expliquer les effets ? L'expression de certains gènes est-elle modifiée ? Ces modifications sont-elles transmises aux générations suivantes ?

• Les données disponibles sur les relations structure-fonction peuvent-elles éclairer la toxicité de substances d'une même famille ?

• Quels sont les principaux axes de recherche à privilégier pour approfondir l'étude des dangers potentiellement liés à une multi-exposition chronique ?

Cinq substances ou familles de substances ont été choisies parce qu'elles sont largement représentées dans les produits de grande consommation : bisphénol A, phtalates, composés polybromés ou retardateurs de flamme, composés perfluorés, parabènes. Les événements de santé considérés en relation avec l'exposition à ces substances sont les caractéristiques quantitatives et qualitatives des spermatozoïdes ainsi que celles de la fertilité (aptitude biologique à obtenir une grossesse), toutes les anomalies des organes impliqués dans la fonction de reproduction (gonades, glande mammaire, système endocrinien), le cancer du testicule et certains cancers dits hormono-dépendants. Les troubles du développement d'autres organes et diverses pathologies, bien que pouvant, dans certains cas, être induits par des expositions durant la vie intra-utérine, n'entrent pas dans le champ de cette expertise.

Un tableau présenté en annexe 2 rassemble les principales données sur chacune des 5 substances ou familles de substances. La difficulté à caractériser le danger associé à l'exposition humaine à chacune de ces substances chimiques est encore plus grande lorsque l'on considère que la majorité de la population (y compris les femmes enceintes et les fœtus) est exposée à un ensemble de substances susceptibles d'avoir des modes d'action très différents. L'étude des effets d'expositions combinées et permanentes aux substances présentes de façon ubiquiste dans l'environnement humain constitue un enjeu crucial de recherche dans l'objectif d'une meilleure gestion du risque.

I

Évolutions temporelles des altérations de la fonction de reproduction humaine

Introduction

L'étude de la détérioration de la fonction de reproduction de l'homme et des animaux, est un vaste domaine scientifique, construit progressivement depuis au moins une vingtaine d'années à partir de plusieurs courants de recherche : les observations de la faune sauvage ; la recherche étiologique concernant l'impact des polluants environnementaux sur la santé (toxicologie animale, épidémiologie humaine) ; l'étude fondamentale (à l'échelle cellulaire et moléculaire) du phénomène de perturbation endocrinienne (s'appuyant schématiquement davantage sur l'expérimentation *in vitro*) ; et enfin l'analyse plus descriptive, concernant les évolutions temporelles de la fonction de reproduction humaine. À ce jour, bien que ces différentes approches soient complémentaires, une synthèse de leurs observations n'a pas été proposée.

Cette première partie fait le point sur les données épidémiologiques descriptives concernant les évolutions temporelles de différents paramètres et troubles de la fonction de reproduction humaine.

Dans l'espèce humaine, bien qu'une détérioration temporelle des caractéristiques spermatiques ait été suggérée par une publication dès le milieu des années 1970, c'est à partir de 1992, avec la publication d'E. Carlsen et coll. qu'un intense débat scientifique sur une détérioration des caractéristiques spermatiques (concentration, mobilité) s'est instauré.

En parallèle, des données solides indiquent une augmentation de l'incidence du cancer du testicule au cours du 20e siècle dans de nombreux pays européens, dont la France. Par ailleurs, les informations concernant certaines malformations des organes génitaux externes masculins (cryptorchidie, hypospadias) sont colligées, sans permettre de conclusion nette sur leur évolution temporelle en l'absence de système de surveillance efficace, comme c'est également le cas pour les caractéristiques spermatiques.

Ces évolutions temporelles, et des arguments physiopathologiques, ont amené à la formulation de l'hypothèse du syndrome de dysgénésie testiculaire (ou TDS), selon laquelle cryptorchidie, hypospadias, cancer du testicule, faible concentration spermatique pourraient trouver leur origine dans une perturbation du développement testiculaire durant la vie intra-utérine. Cependant, si l'hypothèse du syndrome de dysgénésie testiculaire correspond à une base physiologique, elle ne saurait expliquer toutes les altérations retrouvées chez l'homme.

Une détérioration des caractéristiques spermatiques de l'ampleur de celle rapportée dans certaines zones, peut en théorie avoir des conséquences sur l'aptitude biologique des couples à procréer (ou fertilité). Mais, du fait de

l'absence de système de surveillance *ad-hoc*, on dispose de très peu de données directes sur les évolutions temporelles de la fertilité au cours des dernières décennies. Concernant la puberté, les données disponibles dans certains pays montrent une diminution nette de l'âge des premières règles, alors que les connaissances concernant des indicateurs de puberté chez le garçon sont beaucoup plus limitées.

Il faut noter que les études descriptives ayant mis en évidence ces tendances temporelles ne permettent généralement pas d'identifier les facteurs (comportementaux, environnementaux, génétiques...) pouvant les expliquer. De plus, comme la plupart des pathologies, les atteintes de la fonction de reproduction sont généralement d'ordre multifactoriel, et il n'y a pas de raison de penser qu'il existe un unique facteur capable d'expliquer les évolutions temporelles éventuelles, ceci rendant extrêmement complexe la recherche de ces facteurs.

1
Malformations génitales du garçon, hypospadias et cryptorchidie

Au plan international, un certain nombre de registres des malformations du nourrisson indiquent une augmentation des anomalies génitales du garçon observées en période néonatale, en particulier cryptorchidie[1] et hypospadias[2] (Paulozzi, 1999). Pour de telles malformations génitales, qui n'engagent pas le pronostic vital de l'enfant, les données de registre sont généralement considérées comme étant, lorsqu'elles existent, moins exhaustives que les données de registre concernant le cancer (Toppari et coll., 2001 ; Dolk et coll., 2004). Ceci entraîne des difficultés d'interprétation et des controverses car il est difficile d'établir avec certitude à partir de ces registres s'il existe bien réellement une augmentation des malformations congénitales de l'appareil génital du garçon. Un point très important et pas toujours souligné dans les études ou les revues sur le sujet est que les critères définissant la cryptorchidie et l'hypospadias peuvent varier considérablement en fonction des équipes, et que, par exemple, s'agissant de l'hypospadias, les cas les moins graves puissent être déclarés dans certains registres et pas dans d'autres. Concernant la cryptorchidie, son caractère évolutif avec l'âge (descente spontanée du testicule par exemple) ajoute à cette complexité.

Les données disponibles, qu'elles proviennent de registres ou d'études ciblées, indiquent d'importantes différences géographiques de la prévalence de l'hypospadias (tableaux 1.I et 1.III) et de la cryptorchidie (tableaux 1.II et 1.III).

Hypospadias

Concernant les hypospadias, les registres de naissance disponibles ne prennent généralement pas en compte la possibilité de signaler les formes mineures au niveau du gland ou balaniques (Dolk, 2004), bien que ce degré d'hypospadias soit très commun dans les enquêtes en population (Virtanen et coll.,

1. Absence de descente testiculaire, en position scrotale
2. Anomalie de la fermeture de la gouttière urogénitale à la face inférieure du pénis

2001 ; Pierik et coll., 2002 ; Boisen et coll., 2005). Selon les registres, la prévalence de l'hypospadias en Europe serait comprise entre 0,8 et 1,7 pour 1 000 naissances des deux sexes ou 1,6 à 3,4 pour 1 000 nouveau-nés mâles, soit des taux considérablement plus faibles que ceux rapportés dans les études prospectives de population de plusieurs pays (tableau 1.I). Au sein d'un même pays, comme le Danemark, en fonction des critères utilisés, des taux différents d'hypospadias à la naissance sont rapportés dans les registres des hôpitaux (0,52 %) en comparaison à une étude prospective (1,03 % à la naissance ; Boisen et coll., 2005).

Les formes mineures d'hypospadias dans la région du gland deviennent détectables lorsque le phimosis physiologique disparaît ; aussi, pour la prise en compte de cette forme, le moment auquel l'examen clinique est fait, revêt une importance capitale et les taux rapportés à 3 ans peuvent être bien plus élevés que les taux à la naissance : ainsi, au Danemark, une fréquence de l'hypospadias de 4,6 % à 3 ans a été rapportée, contre 1,0 % à la naissance (Boisen et coll., 2005).

Il existe donc un débat toujours en cours quant à savoir s'il y a une augmentation réelle des hypospadias. Celle-ci est signalée dans certaines (mais pas toutes) régions européennes, aux États-Unis et en Australie (Toppari et coll., 2001 ; Porter et coll., 2005 ; Nassar et coll., 2007) (tableau 2.III). La standardisation récente des critères de diagnostic et d'enregistrement des cas peut avoir pour conséquence une augmentation artificielle dans l'évolution de la prévalence.

Tableau 1.I : Données sur la fréquence de l'hypospadias et son évolution au cours des années récentes

Étude Lieu	Période	Nombre de cas/ naissance	Prévalence (%)	Taux pour 10 000 naissances	Évolution
Pierik et coll., 2002 Hollande	1998-2000	53/ 7 292	0,73	38	?
Porter et coll., 2005 État de Washington (États-Unis)	1987-2002	-	-	46 en 1987 50 en 2002	=
Carmichael et coll., 2003 État de Californie (États-Unis)	1984-1997	5 838/ 1 791 659	0,33	-	= (1989-1997)
Lund et coll., 2009 Danemark	1977-2005	3 490/ 921 745	0,38	-	↑
Sun et coll., 2009 Hangzhou (Chine)	1998-2007		0,90	-	↑

Étude Lieu	Période	Nombre de cas/ naissance	Prévalence (%)	Taux pour 10 000 naissances	Évolution
Abdullah et coll., 2007 Nord de l'Angleterre (Royaume-Uni)	1993-2000	-	-	31	↑
Martinez-Frias et coll., 2004 Espagne	1978-2001		0,35		↓

= stable ; ↓ évolution générale à la baisse ; ↑ évolution générale à la hausse

Cryptorchidie

Les données de plusieurs registres ainsi que des études effectuées avec des protocoles de classification similaires suggèrent une augmentation de la prévalence de la cryptorchidie au cours des dernières décennies dans certaines régions ou pays, mais pas dans d'autres (tableaux 1.II et 1.III). Il faut noter que tous les registres de malformations en Europe n'enregistrent pas les cryptorchidies. Des données indicatives mais indirectes, comme les taux publiés d'orchidopexie ne sont généralement pas en faveur d'une augmentation du nombre d'opérations pour fixation de testicules non descendus, indiquant même qu'il pourrait y avoir une diminution de cette chirurgie depuis les années 1990 (Toledano et coll., 2003 ; Richiardi et coll., 2009). Ces différences pourraient être dues en partie à des changements dans les stratégies de traitement et/ou à la disponibilité de ces traitements au cours du temps. Toutefois, l'explication la plus probable réside dans le fait que les formes légères de la cryptorchidie, comme les testicules placés haut dans le scrotum et les testicules descendant spontanément dans les premières années de la vie, ne sont pas traitées chirurgicalement. Or, ce sous-groupe de cryptorchidies semble être celui qui a la plus forte augmentation dans le temps, au moins au Danemark. Dans ce pays, la prévalence de la cryptorchidie à la naissance est de 9 % (Boisen et coll., 2004), un pourcentage bien supérieur à celui déclaré par d'autres pays (par exemple les Pays-Bas, Pierik et coll., 2005) où il apparaît cependant que la recherche de cette malformation est classiquement faite chez le petit enfant et non en période néonatale. Ainsi, la comparaison directe des taux de prévalence rapportés devrait être effectuée avec prudence, car il existe des variations importantes d'une étude à l'autre pour ce qui est de la sélection de la population, de la détermination des cas, du suivi de ces cas et des critères de classement de la cryptorchidie. Concernant ce dernier point, certaines études incluent, dans l'estimation du nombre de cas, les testicules en position haute dans le scrotum comme une forme mineure de cryptorchidie (*John Radcliffe Hospital Cryporchidism Study Group*, 1992 ; Berkowitz et coll., 1993 ; Boisen et coll., 2004), tandis que d'autres n'incluent pas de tels cas (Pierik et coll., 2005). Une étude conjointe sur la prévalence de la cryptorchidie et de l'hypospadias au Danemark et en Finlande pour laquelle il a

été apporté un soin particulier dans la normalisation des définitions et la standardisation des observations cliniques entre observateurs a permis de montrer sans équivoque que la prévalence de la cryptorchidie et de l'hypospadias était significativement plus élevée au Danemark qu'en Finlande (Virtanen et coll., 2001 ; Boisen et coll., 2004, 2005). Avec une approche standardisée, les auteurs ont de plus montré que les jeunes danois en bonne santé avaient une courbe de croissance testiculaire, des volumes testiculaires et des concentrations sériques d'inhibine B plus faibles que les jeunes finlandais. Selon les auteurs, ces résultats observés chez le petit enfant pourraient avoir des conséquences sur la fonction testiculaire adulte et être possiblement un des éléments expliquant les différences dans le même sens de la qualité du sperme ou des taux de LH ou d'inhibine B observés chez les jeunes adultes danois et finlandais (Jorgensen et coll., 2002).

Tableau 1.II : Données sur la fréquence de la cryptorchidie et son évolution au cours des années récentes

Étude Lieu	Période	Fréquence %	Évolution	Commentaires Biais possibles
Campbell et coll., 1987 Écosse (Royaume-Uni)	1961-1985	1,4	↑	+
Bonney et coll., 2009 État de Victoria (Australie)	1999-2006	-	↓	+ évolution des orchidopexies
Abdullah et coll., 2007 Nord de l'Angleterre	1993-2000	0,8	↓	

Tableau 1.III : Données sur hypospadias (toutes formes) et cryptorchidie (2 testicules non en place à la naissance ou au moins un testicule non descendu à 1 an) (d'après *International Clearinghouse Centre for Birth Defects,* 2007)

Lieu	Hypospadias		Cryptorchidie	
	Taux pour 10 000 en 2005	Tendance évolutive	Taux pour 10 000 en 2005	Tendance évolutive
Europe du nord				
Finlande	12,1[a] 2,8[b]			
Norvège	14,7	↑	26,1	↑
Suède	19,6	=		
Europe de l'est				
Rep Tchèque	33,2	↑	non spécifié	↑
Hongrie	28,7	=	18,5	=

Lieu	Hypospadias		Cryptorchidie	
	Taux pour 10 000 en 2005	Tendance évolutive	Taux pour 10 000 en 2005	Tendance évolutive
Slovaquie	20,9	=	7,8	↑
Russie	14,5		13,5	
Ukraine	3,8		48,1	
Europe de l'ouest				
Angleterre+Pays de Galles	7,5	=	0,2	=
Pays de Galles	12,6	↓	1,5	↓
Irlande	6,8	∩		
Allemagne (Saxe)	8,7	∩	16,3	∩
Pays-Bas (Nord)	18,9	∪	non spécifié	↓
France (Rhône Alpes)	10,0	↑		
France (Paris)	13,0	↑		
France (Strasbourg)	18,9	=		
Espagne	1,3	=	2,4	=
Italie (Nord Est)	3,4	↑		
Italie (Toscane)	7,1	∪	2,0	∩
Italie (Emilie Romagne)	14,9	↓		
Italie (Campanie)	5,0	↑		
Italie (Sicile)	24,6	↑	16,5	↑
Malte	23,3	↑		
Amériques				
Canada (Alberta)	22,4	=	22,7	=
Canada (Colombie Britannique)	18,6	↓	30,2	∩
Canada (National)	28,0	=	36,5	=
États-Unis (Texas)	16,3	=	10,5	↑
États-Unis (Atlanta)	3,7	↑	3,3	↓
États-Unis (Utah)	6,3			
Mexique	5,8	=		
Costa Rica	4,9		8,4	
Cuba	10,1	↓	3,5	=
Chili	6,9		9,1	
Amérique du sud	4,1	=	7,1	↑
Autres régions				
Iran	6,8		27,0	
Israel	29,2			
Chine (Pékin)	0,9		0,2	

Lieu	Hypospadias		Cryptorchidie	
	Taux pour 10 000 en 2005	Tendance évolutive	Taux pour 10 000 en 2005	Tendance évolutive
Chine (Prov de Sichuan)	4,6	↑	1,3	↑
Japon	4,6	↑		
Australie (Victoria)	33,5	↑	54,8	↑
Australie (Ouest)	24,6	↓	16,5	∪
Nouvelle-Zélande	23,9[c]	↑	58,9	∩

= stable ; ↓ évolution générale à la baisse ; ∪ tendance à une augmentation après une période de baisse ; ∩ tendance à la baisse après une période d'augmentation ; ↑ évolution générale à la hausse
[a] Formes majeures ; [b] Formes mineures ; [c] Hypospadias+Epispadias[3]

Données françaises sur l'hypospadias et la cryptorchidie

Les seules données sur les évolutions temporelles disponibles en France considérées comme fiables sont celles du rapport 2007 de *l'International clearing house for birth* (ICBD) et celles du registre des malformations de l'Institut européen des génomutations qui indiquent une nette augmentation de l'incidence de l'hypospadias depuis la fin des années 1970 jusqu'au début des années 2000 (figure 1.1). Les données de l'ICBD confirment cette tendance pour les régions parisienne et Rhône-Alpes, mais pas en Alsace où il semble y avoir une stabilité. Il faut noter que c'est en Alsace que des taux les plus élevés sont observés en 2007, avec 19 pour 10 000 *versus* 13 pour 10 000 en Ile-de-France et 10 pour 10 000 en Rhône-Alpes (tableau 2.III). À notre connaissance, il n'y a pas de données extensives de registres ou d'études ciblées en France ou dans certaines de ces régions permettant d'estimer l'incidence et les tendances évolutives de la cryptorchidie au cours des dernières décennies. Cependant, une étude de l'InVS parue en 2004 (Rambourg Schepens et coll., 2004) concernant les différentes régions françaises a montré pour des garçons de moins de 7 ans et selon les régions, des taux de cryptorchidies opérées variant de 17 à 32/10 000 et des taux d'hypospadias opérés variant de 4,9 à 12,8/10 000. Sur la période 1998 à 2001, les taux calculés sont relativement stables, certaines régions présentant cependant une augmentation régulière. Pour la période considérée, une variabilité géographique de ces malformations génitales est mise en évidence. Les régions présentant les taux les plus élevés sont celles qui ont une forte densité de population (régions de l'est et une région de l'ouest de la France).

3. http://www.icbdsr.org/filebank/documents/ar2005/Report2007.pdf

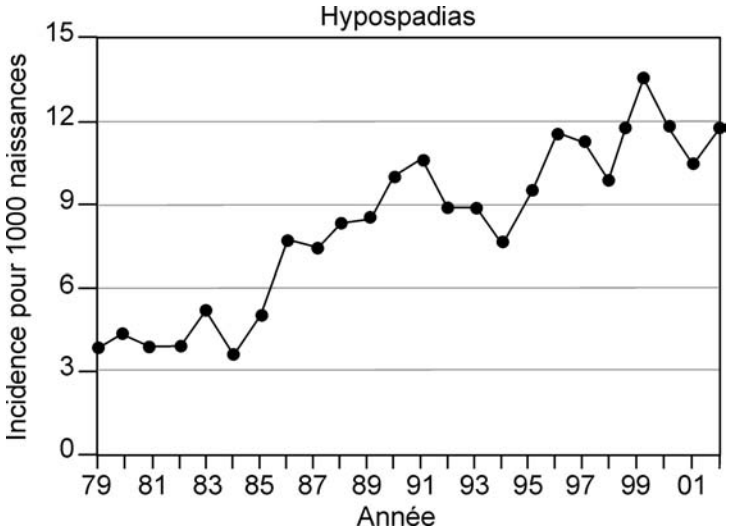


Figure 1.1 : Évolution de l'incidence de l'hypospadias dans un ensemble de départements français entre 1979 et 2001 (Données du registre des malformations/Institut européen des génomutations ; 16 départements, Centre-Est)

Enfin, des données ponctuelles sur des petites populations, étudiées hors du contexte de registres, sont disponibles. Dans le cadre de la cohorte mère-enfants Eden, coordonnée par l'Inserm, et dont le recrutement a eu lieu en 2003-2006, la fréquence des testicules non descendus à la naissance (au moins un testicule absent des bourses) était de 3,4 % des garçons dans la maternité du CHU de Poitiers (16 cas sur 465 naissances masculines) et de 5,1 % dans la maternité du CHU de Nancy (22 cas sur 430 naissances masculines), soit 4,3 % dans l'ensemble (4,1 % après exclusion des naissances prématurées) (Philippat et coll., sous presse).

Syndrome de dysgénésie testiculaire, intérêt et limites du concept

Skakkebæk et ses collaborateurs à Copenhague ont émis l'hypothèse que le cancer du testicule, la mauvaise qualité spermatique, l'hypospadias et la cryptorchidie, étaient interdépendants et seraient la conséquence d'une perturbation du développement testiculaire *in utero*. Ce concept appelé « syndrome de dysgénésie testiculaire » (*testicular dysgenesis syndrome*, TDS ; Skakkebaek et coll., 2001) se fonde sur la juxtaposition de données cliniques, épidémiologiques et de données scientifiques indiquant l'origine fœtale du cancer du testicule, le lien établi entre malformations génitales chez les garçons nouveau-nés et les troubles de la reproduction à l'âge adulte, et sur des

observations provenant d'études expérimentales chez l'animal. Notamment la juxtaposition des données épidémiologiques concernant les pays voisins que sont le Danemark et la Finlande indiquent un parallèle entre ces deux pays pour toutes les anomalies concernées, les fréquences les plus élevées d'hypospadias, de cryptorchidie, de cancer du testicule et la plus médiocre qualité du sperme étant observées au Danemark. Toutes ces données suggèrent que la période prénatale constituerait la phase la plus vulnérable où une anomalie de la différenciation des testicules entraînerait des effets néfastes permanents. Cette anomalie du développement testiculaire pourrait être la conséquence de défauts ou polymorphismes génétiques, d'une exposition à des facteurs nocifs de l'environnement, de facteurs liés au style de vie, de troubles de la croissance intra-utérine et possiblement, de plusieurs de ces facteurs à la fois.

Les auteurs du concept ont été plus loin en suggérant que des produits chimiques perturbateurs du système endocrinien dans l'environnement (et, concernant l'homme, certains facteurs de style de vie moderne) pourraient être une des causes commune à toutes ces anomalies. Cependant, la nature complexe de l'exposition humaine, les différences d'origine génétique des populations et la longue durée de vie sont autant d'obstacles considérables pour étudier les facteurs qui peuvent nuire à la fonction testiculaire adulte, en particulier si les facteurs en cause agissent durant la période pré- ou périnatale. Il convient également de rappeler que la cryptorchidie et l'hypospadias font partie de nombreux syndromes avec malformations congénitales multiples dont certains présentent un caractère familial, une étiologie génétique ayant été identifiée pour certains d'entre eux. Toutefois, se basant sur de larges séries, des mutations génétiques ou des polymorphismes spécifiques à la cryptorchidie ou à l'hypospadias n'ont pu être identifiés pour une proportion significative de patients. Ainsi, pour ces deux anomalies du développement, aucune étiologie distincte ne peut être établie dans la majorité des cas.

En dépit de l'absence de bases épidémiologiques et/ou de la démonstration d'une cause commune entre les différentes anomalies, le concept du TDS a été largement invoqué dans de nombreuses publications. Récemment sous le titre provocateur de « *Does a testicular dysgenesis syndrome exist ?* » une analyse critique a évalué de manière systématique les données épidémiologiques disponibles sur les combinaisons possibles (6) des quatre anomalies du TDS (Akre et Richiardi, 2009). Les auteurs montrent : que la cryptorchidie et l'hypospadias sont associés, mais que le degré de l'association est aussi important voire plus important avec d'autres malformations congénitales non génitales ; qu'il y a une association entre cryptorchidie et infertilité mais qu'il n'existe jusqu'à présent pas de preuve d'une cause commune ; qu'il existe un lien entre cryptorchidie et cancer du testicule, une partie de l'association pouvant être due à des causes communes ; qu'il n'existe pas de données démontrant une association entre l'hypospadias et l'infertilité ou le cancer du testicule ; que l'on ne connaît pas de facteurs de risque communs pour les

quatre composantes du TDS (en dehors de la situation où la cause est génétique). Les auteurs concluent que les études épidémiologiques disponibles ne sont pas en faveur d'une fréquence importante du TDS en l'absence de preuves d'associations liées à une cause commune. Dans un article récent (Jorgensen et coll., 2010), les auteurs du concept du TDS reviennent sur la description originale du TDS en précisant : que le concept n'implique nullement que tous les hommes atteints d'une des anomalies présentent les quatre anomalies ; que les hommes les moins touchés peuvent simplement avoir une hypospermatogenèse, seuls les plus gravement touchés pouvant présenter tous les symptômes ; que selon eux, la majorité des cas de cancers du testicule à cellules germinales et les cryptorchidies sont probablement liés au TDS ; que l'hypospadias isolé ne représente qu'une fraction des cas en rapport avec le TDS tout comme la médiocre qualité spermatique. Quoi qu'il en soit, au cours des dernières années, le TDS, en tant que concept global, a eu des conséquences favorables en inspirant de nouvelles pistes de recherche, notamment des études chez l'homme recherchant de possibles associations entre chacune des anomalies du TDS et des expositions chimiques mesurées dans les fluides biologiques.

Bibliographie

ABDULLAH NA, PEARCE MS, PARKER L, WILKINSON JR, JAFFRAY B, MCNALLY RJ. Birth prevalence of cryptorchidism and hypospadias in Northern England, 1993-2000. *Arch Dis Child* 2007, **92** : 576-579

AKRE O, RICHIARDI L Does a testicular dysgenesis syndrome exist? *Hum Reprod* 2009, **24** : 2053-2060

BERKOWITZ GS, LAPINSKI RH, DOLGIN SE, GAZELLA JG, BODIAN CA, HOLZMAN IR. Prevalence and natural history of cryptorchidism. *Pediatrics* 1993, **92** : 44-49

BOISEN KA, KALEVA M, MAIN KM, VIRTANEN HE, HAAVISTO AM, et coll. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 2004, **363** : 1264-1269

BOISEN KA, CHELLAKOOTY M, SCHMIDT IM, KAI CM, DAMGAARD IN, et coll. Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at 3 months of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90** : 4041-4046

BONNEY T, SOUTHWELL B, DONNATH S, NEWGREEN D, HUTSON J. Orchidopexy trends in the paediatric population of Victoria, 1999-2006. *J Pediatr Surg* 2009, **44** : 427-431

CAMPBELLDM, WEBB JA, HARGREAVE TB. Cryptorchidism in Scotland. *BMJ* 1987, **295** : 1235-1236

CARMICHAELSL, SHAW GM, NELSON V, SELVIN S, TORFS CP, CURRY CJ. Hypospadias in California: trends and descriptive epidemiology. *Epidemiology* 2003, **14** : 701-706

DOLK H, VRIJHEID M, SCOTT JE, ADDOR MC, BOTTING B, et coll. Toward the effective surveillance of hypospadias. *Environ Health Perspect* 2004, **112** : 398-402

INTERNATIONAL CLEARINGHOUSE FOR BIRTH DEFECTS. Annual Report 2007 with data for 2005. The centre of the International clearinghouse for birth defects surveillance and research, Rome, 2007, 326pp

JOHN RADCLIFFE HOSPITAL CRYPTORCHIDISM STUDY GROUP. Cryptorchidism: a prospective study of 7500 consecutive male births, 1984-8. *Arch Dis Child* 1992, **67** : 892-899

JØRGENSEN N, CARLSEN E, NERMOEN I, PUNAB M, SUOMINEN J, et coll. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002, **17** : 2199-2208

JØRGENSEN N, MEYTS ER, MAIN KM, SKAKKEBAEK NE. Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis. *Int J Androl* 2010, **33** : 98-303

LUND L, ENGEBJERG MC, PEDERSEN L, EHRENSTEIN V, NØRGAARD M, SØRENSEN HT. Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005. *Eur Urol* 2009, **55** : 1022-1026

MARTÍNEZ-FRÍAS ML, PRIETO D, PRIETO L, BERMEJO E, RODRÍGUEZ-PINILLA E, CUEVAS L. Secular decreasing trend of the frequency of hypospadias among newborn male infants in Spain. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004, **70** : 75-81

NASSAR N, BOWER C, BARKER A. Increasing prevalence of hypospadias in Western Australia, 1980-2000. *Arch Dis Child* 2007, **92** : 580-584

PAULOZZI LJ. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 1999, **107** : 297-302

PIERIK FH, BURDORF A, NIJMAN JM, DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA SM, JUTTMANN RE, WEBER RF. A high hypospadias rate in the Netherlands. *Hum Reprod* 2002, **17** : 1112-1115

PIERIK FH, BURDORF A, DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA SM, WOLFFENBUTTEL KP, NIJMAN JM, et coll. The cryptorchidism prevalence among infants in the general population of Rotterdam, the Netherlands. *Int J Androl* 2005, **28** : 248-252

PHILIPPAT C, CHEVRIER C, GIORGIS-ALLEMAND L, CORDIER S, CHARLES MA, et coll. Use of analgesics during pregnancy and undescended testis in the offspring within Eden mother-child cohort, (soumis)

PORTER MP, FAIZAN MK, GRADY RW, MUELLER BA. Hypospadias in Washington State: maternal risk factors and prevalence trends. *Pediatrics* 2005, **115** : 495-499

RAMBOURG SCHEPENS MO, PASCAL L., LASALLE JL. Les malformations congénitales du petit garçon en Languedoc-Roussillon. Étude des cryptorchidies et des hypospadias opérés à partir des données du PMSI de 1998 à 2001. Ed. InVS, Drass PACA, Cire Sud, 2004, 56p

RICHIARDI L, VIZZINI L, NORDENSKJÖLD A, PETTERSSON A, AKRE O. Rates of orchiopexies in Sweden: 1977-1991. *Int J Androl* 2009, **32** : 473-478

SKAKKEBÆK NE, RAJPERT-DE MEYTS E, MAIN KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001, **16** : 972-978

SUN G, TANG D, LIANG J, WU M Increasing prevalence of hypospadias associated with various perinatal risk factors in Chinese newborns. *Urology* 2009, **73** : 1241-1245

TOLEDANO MB, HANSELL AL, JARUP L, QUINN M, JICK S, ELLIOTT P. Temporal trends in orchidopexy, Great Britain, 1992-1998. *Environ Health Perspect* 2003; **111** : 129-132

TOPPARI J, KALEVA M, VIRTANEN HE. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001, **7** : 282-286

VIRTANEN HE, KALEVA M, HAAVISTO AM, SCHMIDT IM, CHELLAKOOTY M, et coll. The birth rate of hypospadias in the Turku area in Finland. *APMIS* 2001, **109** : 96-100

2
Qualité du sperme

Dès les années 1970 aux États-Unis, certains médecins se sont inquiétés d'une éventuelle diminution de la qualité du sperme (Nelson et Bunge, 1974), cette question ne suscitant par la suite que de très rares commentaires ou recherches. En 1992, une méta-analyse de 61 articles publiés entre 1938 et 1990 rapporte l'évolution séculaire des valeurs de la concentration spermatique de près de 15 000 hommes en bonne santé et/ou fertiles (Carlsen et coll., 1992). Il ne s'agit pas d'un suivi de cohorte mais d'une analyse écologique d'études qui ont chacune décrit les caractéristiques spermatiques d'hommes recrutés à une période donnée. Pendant la période considérée, la concentration des spermatozoïdes diminuait de 1 % environ par an, de 113 millions par ml en moyenne dans les années 1930 à 66 millions par ml en moyenne 50 ans plus tard. Cette étude a été très discutée ; de multiples biais concernant la sélection des sujets, l'hétérogénéité géographique des populations considérées (biais de confusion), l'erreur de mesure sur les caractéristiques spermatiques, ainsi que des aspects concernant la méthodologie statistique ont été évoqués (revue dans Jouannet et coll., 2001).

L'étude fut par la suite réactualisée selon une méthodologie légèrement différente avec l'inclusion de 40 publications supplémentaires portant sur une période plus longue (Swan et coll., 1997). Selon l'auteur de cette étude, l'ajout de ces publications et le traitement des données permettant de prendre en compte l'origine géographique des sujets, rendant moins probable un biais de confusion lié aux caractéristiques géographiques, confirmait la baisse de la concentration spermatique aussi bien en Amérique du Nord qu'en Europe.

Données en France

Une des conséquences majeures de ces travaux est d'avoir stimulé un effort de recherche sans précédent dans le domaine. Ainsi, par exemple, de nombreuses équipes ont analysé les données dont elles disposaient pour confirmer ou non la baisse de la qualité du sperme. En 1994, par exemple, une équipe française, l'équipe du Cecos (Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humain) de Bicêtre, entreprit l'analyse des caractéristiques du sperme des hommes qui avaient été candidats à un don de sperme depuis 1973 dans ce centre ; l'intérêt de cette approche était de pouvoir étudier une population

moins sélectionnée et homogène d'hommes féconds d'âge pas trop éloignés et recrutés dans les mêmes conditions au fil des ans. Les résultats concluaient à une baisse significative des caractéristiques du sperme dans cette population d'hommes féconds vivant en région parisienne (tableau 2.I). De 1973 à 1994, la chute de la concentration des spermatozoïdes était de l'ordre de 1,6 % par an en moyenne, le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat, meilleur reflet de la production testiculaire, avait diminué d'un tiers pendant la même période, enfin, il existait une diminution significative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux (Auger et coll., 1995). À l'inverse dans une population de même type, une telle diminution séculaire n'était pas retrouvée dans le sud de la France mais la production moyenne de spermatozoïdes était plus basse qu'à Paris dès le début de l'étude mettant en évidence l'existence de différences régionales (Bujan et coll., 1996).

Données dans le monde

Depuis la moitié des années 1990, une trentaine d'autres études rétrospectives longitudinales ont été réalisées dans divers laboratoires. Certaines ont confirmé la baisse, d'autres non (tableau 2.I). L'interprétation des résultats est difficile pour la majorité d'entre elles.

Tableau 2.I : Aperçu des études rétrospectives sur la qualité du sperme publiées depuis 1995 : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats principaux

Étude Lieu	Période	Nombre d'hommes (nb moyen/an)	Type de population	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence[a]	Concentration spermatozoïdes[b]	Autres caractéristiques[c]
Années 1960/ 1970						
Auger et coll., 1995 Paris (France)	1973-1992	1 351 (68)	CDSNS, pères	2	↓[d]	NSvol ↓mob ↓morph
Bujan et coll., 1996 Toulouse (France)	1977-1992	302 (19)	CDSNS, pères	1	NS	ND
Vierula et coll., 1996 Turku (Finlande)	1967-1994	5 481 (196)	SFI et INF	2	NS	↓vol
Menchini Fabris et coll., 1996 Pise (Italie)	1970-1990	4 518 (215)	INF	0	↓	ND
Adamopoulos et coll., 1996 Athènes[e] (Grèce)	1977-1993	2 385 (88)	INF	1	↓↓	ND

Étude Lieu	Période	Nombre d'hommes (nb moyen/an)	Type de population	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence[a]	Concentration spermatozoïdes[b]	Autres caractéristiques[c]
Van Waeleghem et coll., 1996 Gand (Belgique)	1977-1995	416 (22)	CDSNS, SFI	0	↓	NSvol ↓mob ↓morph
Nieschlag et Lerchl., 1996 Münster (Allemagne)	1977-1993	187 (11)	DR	0	NS	ND
Fisch et coll., 1996 New York (EU)	1972-1994	400 (17)	PREV, pères et SFI	2	↑	NSvol NSmob
Fisch et coll., 1996 Los Angeles (EU)	1978-1994	221 (13)	PREV, SFI	2	↑	NSvol NSmob
Paulsen et coll., 1996 Seattle (EU)	1972-1993	510 (23)	DR	0	NS	NSvol NSmorph
Zheng et coll., 1997 Danemark	1968-1992	8 608 (344)	INF	2	↓[d]	NSvol ↓morph
Itoh et coll., 2001 Sapporo (Japon)[f]	1975-1998	711 (30)	SFI++ et pères	0	NS	NSvol
Années 1980						
De Mouzon et coll., 1996 France[g]	1989-1994	7 714 (482)	PFOT	0	↓	ND
Irvine et coll., 1996 Edimbourg (RU)	1984-1995	577 (48)	DR, pères et SFI	0	↓[d]	ND
Berling et Wolner-Hanssen, 1997 Suède sud	1985-1995	718 (65)	INF	1	↑	↓vol ↑mob ↑morph
Benshushan et coll., 1997 Jérusalem (Israel)	1980-1995	188 (12)	CDSNS, SFI	0	NS	↑vol ↓mob
Handelsman 1997 Sydney (Australie)	1980-1995	509 (32)	CDSNS, pères	0	NS	ND
Younglai et coll., 1998 Canada[h]	1984-1996	48 968 (3 766)	INF	0	↓	ND
Seo et coll., 2000 Corée	1989-1998	22 249 (2 225)	INF	0	NS	NSvol NSmob
Années 1990						
Rasmussen et coll., 1997 Odense (Danemark)	1990-1996	1 055 (151)	PFOT	0	NS	NSvol
Almagor et coll., 2003 Jérusalem (Israel)	1990-2000	2 638 (240)	INF	0	↓	↓mob

Étude Lieu	Période	Nombre d'hommes (nb moyen/an)	Type de population	Prise en compte des covariables âge, délai d'abstinence[a]	Concentration spermatozoïdes[b]	Autres caractéristiques[c]
Sripada et coll., 2007 Écosse nord (RU)	1994-2005	4 832 (403)	INF[i]	2	↓	NSmob
Feki et coll., 2009 Sfax (Tunisie)	1996-2007	2 940 (245)	INF	2	↓	NS mob ↓ morph

CDSNS : candidats au don de spermatozoïdes non sélectionnés ; SFI : statut de fertilité inconnu ; INF : infécond ; DR : Donneur de sperme pour la recherche ; PREV : pré-vasectomie ; PFOT : partenaires de femmes avec obstruction tubaire.
[a] 0 : aucun ajustement, 1 : ajustement sur âge ou délai d'abstinence, 2 : ajustement sur âge et délai d'abstinence ; [b] ↓ diminution significative, ↑ augmentation significative, NS pas de différence significative ; [c] vol : volume de l'éjaculat, mob : % de spermatozoïdes progressifs, morph : % de spermatozoïdes morphologiquement normaux ; [d] baisse avec année naissance plus récente ; [e] Nombre total de spermatozoïdes mesuré dans 3 laboratoires différents à Athènes ; [f] Comparaisons de deux périodes 1975-80 vs 1998 ; [g] Résultats de 77 centres ; [h] Résultats de 11 centres d'exploration des infertilités du couple ; [i] sélection des hommes ayant plus de 20 millions/ml spermatozoïdes ; [j] Nombre total de spermatozoïdes par éjaculat

Différences géographiques

La confrontation des résultats des études portant sur les variations séculaires de la qualité du sperme indique des variations notables de la qualité moyenne du sperme humain d'une région du monde à l'autre dans des sous-populations grossièrement comparables (Carlsen et coll., 1992 ; Swan et coll., 1997). Ces différences ont fait émerger le postulat qu'indépendamment de facteurs génétiques ou ethniques, ces variations pouvaient aussi être liées à des facteurs environnementaux. Des études épidémiologiques de type transversal ont été menées afin de rechercher s'il existe des variations géographiques de la production des spermatozoïdes et de la qualité du sperme en relation avec un certain nombre de facteurs relatifs aux antécédents, au style de vie, à l'environnement général ou professionnel des hommes. La première recherche programmée de manière spécifique sur le sujet a été financée par l'Union Européenne. Elle a été menée dans 4 villes européennes : Turku (Finlande), Copenhague, Edimbourg et Paris. Les hommes recrutés étaient tous partenaires de femmes enceintes (donc ayant en principe fait récemment la preuve de leur fertilité). Les méthodes d'analyse de sperme utilisées dans les 4 centres étaient standardisées et ont fait l'objet d'un contrôle de qualité. Les principaux facteurs susceptibles de biaiser les résultats comme l'âge ou le délai d'abstinence sexuelle précédant l'examen, ont pu être pris en compte dans l'analyse. Cette étude a mis en évidence des différences importantes de la quantité des spermatozoïdes ; elle était la plus faible à Copenhague et la plus élevée à Turku (Jorgensen et coll., 2001). En procédant à une analyse détaillée ville par ville, il a été trouvé que par rapport à Turku le nombre de spermatozoïdes était significativement plus bas dans les trois autres villes ; en revanche, la mobilité des spermatozoïdes était plus faible à Paris que dans les autres villes. Depuis, plusieurs études fondées sur une méthodologie similaire ont été publiées (tableau 2.II). La majorité d'entre elles indique des différences géographiques de la production et de la qualité spermatique d'une part

avec des niveaux de productions spermatiques assez faibles lorsqu'il s'agit des sujets étudiés les plus jeunes, notamment au Danemark. Pour l'essentiel ces études en dépit de questionnaires très détaillés ne rapportent pas d'associations avérées avec des facteurs de l'environnement.

Tableau 2.II : Principales études sur les variations géographiques de la production et/ou de la qualité spermatique publiées depuis 1995 : lieux, périodes d'étude, populations étudiées, facteurs d'ajustement, résultats

Étude Lieux	Période	Type d'étude	Type de population	Prise en compte de covariables âge, délai d'abstinence	Différences
Auger et Jouannet, 1997 France Lille/Rennes/Caen/Paris/ Bordeaux/Grenoble/ Toulouse	1973-1992	Rétrospective	CDSNS, pères N=	oui	≠vol ≠conc ≠mob (morphND)
Fisch et coll., 1996 États-Unis Californie/Minnesota / New York	1972-1994	Rétrospective	CDSNS, PREV, SFI N=400	non	≠conc
Jorgensen et coll., 2001 Europe Edimbourg/Turku/ Copenhague/ Paris	1977-1992	Transversale	PFE[a] N=1 082	oui	ND
Iwamoto et coll., 2006 Japon (Kawasaki/ Yokohama *vs* Europe (étude précédente)	1998	Transversale	PFE N=324	oui	≠conc ≠ntot ≠mob ≠morph
Swan et coll., 2003 États-Unis	1999-2001	Transversale	PFE N=512	oui	
Jorgensen et coll., 2002 Danemark/Norvège/ Finlande/Estonie	1997-2000	Transversale	C[b], HPG N=968	oui	≠conc ≠ntot (gradient est-ouest)
Punab et coll., 2002 Lithuanie/Estonie *vs* étude précédente	1997-1999	Transversale	C+HPG N=393	oui	≠conc ≠ntot conc et ntot > valeurs dans l'étude précédente
Tsarev et coll., 2005 Lettonie *vs* études précédentes	2004	Transversale	C N=133	non	=conc études précédentes sauf vs Danemark

Étude Lieux	Période	Type d'étude	Type de population	Prise en compte de covariables âge, délai d'abstinence	Différences
Dhooge et coll., 2007 Flandres Anvers (ville) Peer (campagne)	1970-1990	Transversale	HPG[c], SFV[d] N=100	non	=vol =conc ≠ntot ≠morph
Paasch et coll., 2008 Allemagne Hambourg/Liepzig	2003-2005	Transversale	C? SFI N=811	non	=conc ≠mob ≠morph

[a] PFE : volontaires, partenaires de femme enceinte ; [b] C : Conscrits ; [c] HPG : hommes volontaires de la population générale 20-40 ans tirés au sort contactés par courrier ; [d] SFV : statut de fertilité variable ; SFI : statut de fertilité inconnu
CDSNS : candidats au don de spermatozoïdes non sélectionnés ; PREV : pré-vasectomie ; vol : volume de l'éjaculat ; conc : concentration du sperme ; mob : % de spermatozoïdes progressifs ; morph : % de spermatozoïdes morphologiquement normaux ; ntot : nombre total de spermatozoïdes

Limites des études rétrospectives et transversales portant sur la qualité du sperme

Les tableaux précédents montrent bien la diversité des populations d'hommes étudiés, ainsi que la variabilité dans les choix méthodologiques ou encore la taille des échantillons. Quelles que soient les populations étudiées, il existe de possibles biais de sélection. Par exemple, il peut s'agir de la modification du recrutement du à la mise en place de nouvelles pratiques d'AMP (assistance médicale à la procréation), telle que l'ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection)*, dans les laboratoires analysant le sperme d'hommes inféconds ou bien, existence d'antécédents génito-urinaires chez des hommes féconds les incitant à être volontaires pour participer à des études sur le sperme (Eustache et coll., 2004 ; Muller et coll., 2004). Il est à noter que dans ce dernier cas les taux de participation sur le nombre d'hommes informés est faible, entre 15 et 40 % au mieux, selon les études. Dans bien des cas, les sujets sont auto-sélectionnés et on ne dispose pas de l'estimation du taux de participation.

D'autre part, il faut souligner que les données portant sur le sperme et provenant de laboratoires différents ne peuvent être considérées ni comme des données exactes ni comme des données strictement comparables. En effet, l'analyse du sperme correspond à un ensemble de procédures de laboratoire complexes dont la plupart repose sur l'évaluation microscopique dépendant de la compétence des équipes. Les formations initiales et continues des professionnels ont un rôle capital tout comme le degré d'expérience pour la qualité des résultats produits (Auger et coll., 2000 ; Eustache et Auger, 2003). De plus, du fait du caractère manuel de la plupart des procédures au laboratoire de

biologie de la reproduction, le contrôle de qualité (CQ) des analyses biologiques est encore plus indispensable que pour les autres actes de biologie médicale essentiellement effectués à l'aide d'automates. Enfin, les conclusions d'une analyse doivent absolument tenir compte de l'erreur de mesure. En effet les valeurs produites de concentration (en millions/ml), mobilité ou morphologie typique se fondent sur une évaluation d'un nombre limité de spermatozoïdes (de l'ordre d'une ou plusieurs centaines quand cela est possible). En raison de ce petit nombre et également de l'hétérogénéité du sperme, le postulat que le petit échantillon de spermatozoïdes à partir desquels ces caractéristiques ont été évaluées est représentatif de l'ensemble de l'échantillon ne peut s'appliquer : en fonction du nombre de spermatozoïdes évalués il y a une erreur de comptage plus ou moins importante et une incertitude plus ou moins grande autour de la valeur fournie.

Il existe d'autres facteurs de variation, facteurs peu contrôlables lorsqu'ils sont liés à la situation dans laquelle les éjaculats sont produits. Pour des conditions données de recueil, des facteurs tels que l'âge, le délai d'abstinence sexuel, sont des covariables contrôlables qui devraient systématiquement être collectées et prises en compte dans les analyses statistiques ce qui n'a pas été le cas pour un certain nombre d'études publiées (voir tableaux 2.I et 2.II).

Qu'est-ce qui pourrait expliquer une détérioration temporelle des caractéristiques spermatiques ?

Dans une lettre au journal *Epidemiology*, Czeizel et Rothman (2002) avaient suggéré qu'une telle diminution de la pression de sélection envers les couples peu fertiles était plausible, du fait de la diminution de la taille de la descendance souhaitée par les couples au cours du 20e siècle ; la diminution de la taille des familles (fécondité) des couples fertiles pourrait entraîner une baisse du nombre total de nouveau-nés et donc, mécaniquement, une augmentation de la proportion d'enfants nés de couples peu fertiles dans la population. Si on suppose que l'hypofertilité a une composante héréditaire forte, cette augmentation de la proportion d'enfants nés de couples peu fertiles entraînerait une augmentation de la proportion de sujets ayant eux-mêmes des troubles de la fertilité (Czeizel et Rothman, 2002). Il a été montré, à partir des données de fécondité française, que cette hypothèse n'était pas compatible avec les données sur l'évolution de la fécondité (descendance finale) en France au cours du 20e siècle, et que l'évolution de la pression de sélection sur les couples peu fertiles ne pouvait expliquer qu'une très faible part de la diminution de la concentration spermatique décrite dans la seconde moitié du 20e siècle (Slama et Leridon, 2002).

De nombreuses études épidémiologiques se sont attachées à mettre en évidence l'impact de facteurs environnementaux sur la concentration spermatique, avec parfois comme objectif affiché d'identifier celui susceptible d'expliquer une diminution de la médiane de la concentration spermatique d'environ 50 % en 50 ans.

Les résultats les plus probants concernent notamment des expositions professionnelles (Jensen, et coll., 2006), et notamment l'exposition professionnelle au pesticide DBCP (dibromochloropropane), à des doses probablement élevées, dans les années 1970, qui s'est révélée susceptible d'accroître fortement le risque d'azoospermie (Whorton, et coll., 1977 ; Whorton et Foliart, 1988), l'exposition professionnelle au plomb inorganique (Bonde, et coll., 2002), à la chaleur, aux rayonnements ionisants ou à d'autres composés chimiques comme les éthers de glycol, le dibromure d'éthylène (autrefois utilisé comme additif dans l'essence et comme pesticide), le disulfide de carbone ou certains pesticides (Perry, 2008). En population générale, beaucoup de facteurs sont suspectés mais peu de facteurs ont été clairement identifiés ; le surpoids (Jensen, et coll., 2004), qui peut avoir en partie une origine environnementale (Karmaus et coll., 2009), et aussi l'exposition au tabac durant la vie intra-utérine. Cette exposition a été associée à une diminution d'environ 20 % de la concentration spermatique à l'âge adulte, par rapport à des hommes dont la mère ne fumait pas lorsqu'elle était enceinte (Jensen et coll., 2005, Ramlau-Hansen et coll., 2007). Plus récemment, une étude chez des fœtus a mis en évidence une diminution du nombre de cellules germinales et somatiques dans le testicule lorsque la mère fumait (Mamsen et coll., 2010).

Un calcul simple (Slama, non publié) peut permettre de considérer ces résultats dans la perspective de la détérioration temporelle de la concentration spermatique. Plaçons-nous dans le cas d'un facteur environnemental apparu au cours du 20e siècle, auquel aucune femme n'était exposée en 1920 et auquel 40 % des femmes enceintes étaient exposées en 1970 ; supposons de plus que l'exposition intra-utérine à ce facteur entraîne systématiquement une diminution de 20 % de la concentration spermatique, que la concentration spermatique des hommes âgés de 30 ans en 1950 était de 100 millions/ml. Ces hypothèses sont proches des connaissances actuelles sur l'effet de l'exposition intra-utérine au tabac. Supposons enfin que la prévalence d'aucun autre facteur influençant la concentration spermatique ne varie au cours du 20e siècle. On peut alors estimer que la concentration spermatique moyenne des hommes âgés de 30 ans en 2000 serait de 92 millions/ml (tableau 2.III). Ceci correspond à une diminution de 8 % de la concentration spermatique moyenne en 50 ans.

Tableau 2.III : Exemple hypothétique de la variation de la concentration spermatique moyenne entre 1950 et 2000 chez les hommes de 30 ans (nés en 1920 et 1970) du fait de l'augmentation de la prévalence d'un facteur environnemental chez les femmes enceintes

Année	Prévalence de l'exposition[a] (%)	Concentration spermatique (millions/ml)		
		Non exposés	Exposés	Ensemble
1920	0	100	80	100 × 1 + 0 × 80 =100
1970	40	100	80	100 × 0,6 + 80 × 0,4=92

[a] Fréquence de l'exposition chez les femmes enceintes l'année considérée. Le facteur est supposé diminuer de 20 % la concentration spermatique chez tous les hommes exposés *in utero* (Slama, communication personnelle)

Cet exemple fait apparaître qu'un facteur ayant une influence conséquente sur la concentration spermatique au niveau individuel (–20 %) et dont la prévalence aurait fortement augmenté durant 50 ans (+40 %) ne pourrait entraîner qu'une relativement faible diminution de la concentration spermatique. Il faut donc supposer l'existence d'un nombre important de facteurs dont la prévalence aurait fortement augmenté sur la même période pour attendre une diminution de la concentration spermatique de l'ordre de grandeur de 50 %. Ceci illustre d'une part qu'à moins de supposer l'existence d'un facteur ayant un impact majeur au niveau individuel (par exemple une oligozoospermie quasi-systématique) et dont la prévalence aurait considérablement augmenté au cours des dernières décennies, c'est plutôt un ensemble de facteurs ayant chacun un impact limité au niveau individuel et agissant simultanément, voire en synergie, qui pourrait expliquer une diminution conséquente de la concentration spermatique au sein de la population. D'autre part, cet exemple incite à adopter une approche réellement multifactorielle en épidémiologie, c'est-à-dire qui ne se contenterait pas de prendre en compte des facteurs de risque connus de l'événement étudié comme facteurs d'ajustement, mais qui viserait à estimer l'effet simultané d'un ensemble de facteurs environnementaux. La toxicologie est en train de prendre un tel virage (Kortenkamp, 2007 et 2008 ; Kortenkamp et coll., 2007) ; pour l'épidémiologie, les défis posés par une telle approche concernent bien sûr en premier lieu l'estimation des expositions, mais aussi l'augmentation considérable de la taille de la population étudiée qu'une caractérisation précise de l'effet du mélange impliquerait probablement.

Bibliographie

ADAMOPOULOS D, PAPPA A, NICOPOULOU S, ANDREOU E, KARAMERTZANIS M, MICHOPOULOS J, et coll. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod* 1996, **11** : 1936-1941

ALMAGOR M, IVNITZKI I, YAFFE H, BARAS M. Changes in semen quality in Jerusalem between 1990 and 2000: a cross-sectional and longitudinal study. *Arch Androl* 2003, **49** : 139-144

ANDOLZ P, BIELSA MA, VILA J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod* 1999, **14** : 731-735

AUGER J, JOUANNET P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. Fédération Francaise des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. *Hum Reprod* 1997, **12** : 740-745

AUGER J, KUNSTMANN JM, CZYGLIK F, JOUANNET P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995, **332** : 281-285

AUGER J, EUSTACHE F, DUCOT B, BLANDIN T, DAUDIN M, DIAZ I, et coll. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality

assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000, **15** : 2360-2368

BENSHUSHAN A, SHOSHANI O, PALTIEL O, SCHENKER JG, LEWIN A. Is there really a decrease in sperm parameters among healthy young men? A survey of sperm donations during 15 years. *J Assist Reprod Genet* 1997, **14** : 347-353

BERLING S, WÖLNER-HANSSEN P. No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. *Hum Reprod* 1997, **12** : 1002-1005

BONDE JP, JOFFE M, APOSTOLI P, DALE A, KISS P, et coll. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med* 2002, **59** : 234-234

BUJAN L, MANSAT A, PONTONNIER F, MIEUSSET R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ* 1996, **312** : 471-472

CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N, SKAKKEBAEK NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992, **305** : 609-613

CZEIZEL A, ROTHMAN KJ. Does relaxed reproductive selection explain the decline in male reproductive health? A new hypothesis. *Epidemiology* 2002, **13** : 113-114

DE MOUZON J, THONNEAU P, SPIRA A, MULTIGNER L. Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950. *BMJ* 1996, **313** : 43

DHOOGE W, VAN LAREBEKE N, COMHAIRE F, KAUFMAN JM. Regional variations in semen quality of community-dwelling young men from Flanders are not paralleled by hormonal indices of testicular function. *J Androl* 2007, **28** : 435-443

EUSTACHE F, AUGER J Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod* 2003, **18** : 1018-1022

EUSTACHE F, AUGER J, CABROL D, JOUANNET P. Are volunteers delivering semen samples in fertility studies a biased population? *Hum Reprod* 2004, **19** : 2831-2837

FEKINCABID N, REBAI A, SELLAMI A, AYED BB, GUERMAZI M, et coll. Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the South of Tunisia. *J Androl* 2009, **30** : 541-547

FISCH H, GOLUBOFF ET. Geographic variations in sperm counts: a potential bias in studies on semen quality. *Fertil Steril* 1996, **65** : 1044-1046

FISCH H, GOLUBOFF ET, OLSON JH, FELDSHUH J, BRODER SJ, BARAD DH. Semen analysis in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 2000, **65** : 1009-1014

GYLLENBORG J, SKAKKEBAEKNENIELSENNCKEIDING N, GIWERCMAN A. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *Int J Androl* 1999, **22** : 28-36

HANDELSMAN DJ. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. *Hum Reprod* 1997, **12** : 2701-2705

IRVINE S, CAWOOD E, RICHARDSON D, MACDONALD E, AITKEN J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study of 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996, **312** : 467-470

ITOH N, KAYAMA F, TATSUKI TJ, TSUKAMOTO T. Have sperm counts deteriorated over the past 20 years in healthy, young Japanese men? Results from the Sapporo area. *J Androl* 2001, **22** : 40-44

IWAMOTO T, NOZAWA S, YOSHIIKE M, HOSHINO T, BABA K, MATSUSHITA T, et coll. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod* 2006, **21** : 760-765

JENSEN TK, ANDERSSON AM, JØRGENSEN N, ANDERSEN AG, CARLSEN E, et coll. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004, **82** : 863-870

JENSEN MS, MABECK LM, TOFT G, THULSTRUP AM, BONDE JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod* 2005, **20** : 2559-2566

JENSEN TK, BONDE JP, JOFFE M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med (Lond)* 2006, **56** : 544-553

JØRGENSEN N, ANDERSEN AG, EUSTACHE F, et coll. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001, **16** : 1012-1019

JØRGENSEN N, CARLSEN E, NERMOEN I, et coll. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002, **17** : 2199-2208

JOUANNET P, WANG C, EUSTACHE F, KOLD-JENSEN T, AUGER J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 2001, **109** : 333-344

KARMAUS W, OSUCH JR, ENELI I, MUDD LM, ZHANG J, et coll. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. *Occup Environ Med* 2009, **66** : 143-149

KORTENKAMP A, FAUST M, SCHOLZE M, BACKHAUS T. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environ Health Perspect* 2007, **115** (suppl 1) : 106-114

KORTENKAMP A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl* 2008, **31** : 233-240

KORTENKAMP A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 2007, **115** (suppl 1) : 98-105

LACKNER J, SCHATZL G, WALDHÖR T, RESCH K, KRATZIK C, MARBERGER M. Constant decline in sperm concentration in infertile males in an urban population: experience over 18 years. *Fertil Steril* 2005, **84** : 1657-1661

MAMSEN LS, LUTTERODT MC, ANDERSEN EW, SKOUBY SO, SØRENSEN KP, et coll. Cigarette smoking during early pregnancy reduces the number of embryonic germ and somatic cells. *Hum Reprod* 2010, **25** : 2755-2761

MENCHINI-FABRIS F, ROSSI P, PALEGO P, SIMI S, TURCHI P. Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. *Andrologia* 1996, **28** : 304

MULLER A, DE LA ROCHEBROCHARD E, LABBÉ-DECLÈVES C, JOUANNET P, BUJAN L, et coll. A Selection bias in semen studies due to self-selection of volunteers. *Hum Reprod* 2004, **19** : 2838-2844

NELSON CM, BUNGE RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril* 1974, **25** : 503-507

NIESCHLAG E, LERCHL A. Declining sperm counts in European men--fact or fiction? *Andrologia* 1996, **28** : 305-306

PAASCH U, SALZBRUNN A, GLANDER HJ, PLAMBECK K, SALZBRUNN H, et coll. Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a co-ordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. *Int J Androl* 2008, **31** : 93-102

PAULSENCABERMAN NG, WANG C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril* 1996, **65** : 1015-1020

PERRY MJ. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2008, **14** : 233-242

PUNAB M, ZILAITIENE B, JØRGENSEN N, HORTE A, MATULEVICIUS V, PEETSALU A, SKAKKEBAEK NE. Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int J Androl* 2002, **25** : 243-252

RAMLAU-HANSEN CH, THULSTRUP AM, STORGAARD L, TOFT G, OLSEN J, BONDE JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007, **165** : 1372-1379

RASMUSSEN PE, ERB K, WESTERGAARD LG, LAURSEN SB. No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1,055 Danish men born between 1950 and 1970. *Fertil Steril* 1997, **68** : 1059-1064

SEO JT, RHA KH, PARK YS, LEE MS. Semen quality over a 10-year period in 22,249 men in Korea. *Int J Androl* 2000, **23** : 194-198

SLAMA R, LERIDON H. How much of the decline in sperm counts can be explained by relaxed reproductive selection? *Epidemiology* 2002, **13** : 613-615

SRIPADA S, FONSECA S, LEE A, HARRILD K, GIANNARIS D, et coll. Trends in semen parameters in the northeast of Scotland. *J Androl* 2007, **28** : 313-319

SWAN SH, BRAZIL C, DROBNIS EZ, LIU F, KRUSE RL, HATCH M, et coll. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 414-420

SWAN SH, ELKIN EP, FENSTER L Have sperm densities declined? A re-nalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 1997, **105** : 1228-1232

TSAREV I, GAGONIN V, GIWERCMAN A, ERENPREISS J. Sperm concentration in Latvian military conscripts as compared with other countries in the Nordic-Baltic area. *Int J Androl* 2005, **28** : 208-214

VAN WAELEGHEM K, DE CLERCQ N, VERMEULEN L, SCHOONJANS F, COMHAIRE F. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Hum Reprod* 1996, **11** : 325-329

VIERULA M, NIEMI M, KEISKI A, SAARANEN M, SAARIKOSKI S, SUOMINEN J. High and unchanged sperm counts of Finnish men. *Int J Androl* 1996, **19** : 11-17

WHORTON D, FOLIART D. DBCP: eleven years later. *Reprod Toxicol* 1988, **2** : 155-161

WHORTON D, KRAUSS RM, MARSHALL S, MILBY TH. Infertility in male pesticide workers. *Lancet* 1977, **2** : 1259-1261

YOUNGLAI EV, COLLINS JA, FOSTER WG. Canadian semen quality: an analysis of sperm density among eleven academic fertility centers. *Fertil Steril* 1998, **70** : 76-80

ZHENG Y, BONDE JP, ERNST E, MORTENSEN JT, EGENSE J. Is semen quality related to the year of birth among Danish infertility clients? *Int J Epidemiol* 1997, **6** : 1289-1297

ZORN B, VIRANT-KLUN I, VERDENIK I, MEDEN-VRTOVEC H. Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. *Int J Androl* 1999, **22** : 178-183

3
Fertilité des couples

Le fait que la production de spermatozoïdes ou leur mobilité soit altérée témoigne d'une dysfonction de la physiologie de la spermatogenèse ou de la maturation du gamète mâle. La conséquence la plus évidente de cette pathologie pourrait être une diminution de l'aptitude à concevoir. En effet, du point de vue de la santé publique, une détérioration des caractéristiques spermatiques n'a de conséquence que si elle a des répercussions sur l'aptitude des couples à concevoir, ou sur la proportion de couples susceptibles d'avoir recours à une assistance médicale à la procréation, ou encore sur la proportion de couples n'obtenant pas le nombre d'enfants qu'ils souhaitent.

Les données sur l'évolution temporelle de la fécondité ou du recours à l'assistance médicale à la procréation ne peuvent être interprétées directement, plusieurs facteurs comportementaux, sociaux, psychologiques ou liés à l'évolution de la palette de l'offre médicale en termes d'assistance médicale à la procréation étant susceptibles d'avoir un rôle majeur et difficilement contrôlable sur ces tendances. Des études sur les tendances temporelles de marqueurs de fertilité des couples moins dépendants de ces facteurs sociaux et psychologiques, tels que la fécondabilité ou l'infécondité involontaire de 12 ou 24 mois, pourraient permettre de discuter la plausibilité d'une évolution temporelle de la fertilité biologique des couples. De telles études sont très rares (Leridon, 1991 ; Joffe, 2000 ; Jensen et coll., 2005 ; Scheike et coll., 2008). Des travaux plus indirects, reposant sur des simulations, ont également été réalisés (Bonde et coll., 1999 ; Slama et coll., 2004 ; Leridon et Slama, 2008). Avant d'analyser ces travaux, il est important de définir les principales notions relatives à la fertilité des couples.

Fertilité, fécondité : définitions

La fertilité est l'aptitude biologique des couples à obtenir une naissance vivante. La fécondité désigne le nombre d'enfants d'une femme ou d'un couple. Le terme infécond désigne le fait de ne pas avoir eu d'enfant, indépendamment de la raison, qui peut aussi bien résulter d'un choix du couple que d'une infertilité (biologique). Si on veut indiquer que cette infécondité est subie par le couple, on utilise l'expression d'infécondité involontaire, en général assortie d'une notion de durée (par exemple, infécondité involontaire

de 12 mois). La fécondité dépend fortement, au niveau de la société, de la politique vis-à-vis des familles (structures et modalités de garde des enfants, congés maternité ou paternité, accès des femmes au travail, allocations familiales...) et au niveau personnel des caractéristiques et choix des couples. Pour ces raisons, la fécondité est généralement considérée comme un piètre marqueur de la fertilité des couples, même si des tentatives ont été faites pour interpréter des évolutions de la fécondité dans certains groupes de la population comme le signe de tendance de la fertilité. Ainsi, des auteurs danois ont interprété la diminution du taux de fécondité des adolescentes (à un âge où l'essentiel des grossesses sont non prévues) comme suggérant une diminution de la fertilité des jeunes danois (Jensen et coll., 2002).

La notion de fécondabilité correspond à la probabilité mensuelle (ou par cycle menstruel) de grossesse pour des couples n'utilisant pas de méthode contraceptive (Gini, 1924). Son utilisation s'est d'abord limitée à la démographie (Leridon, 1973), avant de passer dans le champ de l'épidémiologie dans les années 1980 (Schwartz et Mayaux, 1982 ; Baird et coll., 1986). Cette notion a été utilisée tant pour décrire la fertilité des couples que pour étudier l'influence de paramètres biologiques ou de facteurs environnementaux sur la fertilité.

L'approche principalement utilisée pour estimer la fécondabilité consiste à identifier un échantillon de grossesses (en se limitant souvent à celles ayant abouti à une naissance vivante, pour des raisons de qualité de mémorisation) et à mesurer rétrospectivement le délai nécessaire pour concevoir (DNC) ces grossesses, soit à partir des registres de naissance dans les études historiques (Gini, 1924), soit en interrogeant directement les femmes juste après, voire des années après l'accouchement. Il s'agit de « l'approche reposant sur les grossesses » (Joffe et coll., 2005). Une limite potentielle de cette approche tient aux erreurs de mesure, liées notamment à la difficulté d'identifier précisément, dans ce contexte rétrospectif, les grossesses survenues alors que le couple utilisait une méthode de contraception, et aux erreurs de mémorisation des couples sur la durée écoulée entre l'arrêt de la contraception et le début de la grossesse. Enfin, le fait que les tentatives de grossesse infructueuses soient exclues, est susceptible de biaiser l'effet estimé des facteurs environnementaux sur la fertilité (Sallmen, 2001 ; Slama et coll., 2004).

La connaissance du délai nécessaire avant une grossesse éventuelle dans une population incluant les couples restant sans enfant permet de définir la proportion de couples souffrant d'infécondité involontaire de 12 mois, ou davantage. Plutôt que la fécondabilité, c'est la connaissance des taux d'infécondité involontaire à 12 ou 24 mois qui constitue l'information pertinente du point de vue de la santé publique, car cette infécondité involontaire détermine plus directement (mais pas automatiquement) les souffrances du couple et influence le recours éventuel à des traitements médicaux d'assistance à la procréation qui peuvent être longs et douloureux.

Études rétrospectives sur la fertilité des couples : données internationales

Un très petit nombre d'études ont cherché à décrire des variations temporelles de la fertilité (ou de l'infécondité involontaire) des couples au cours des dernières décennies (discuté par Joffe, 2009) ; elles concernent des populations vivant au Royaume-Uni (Joffe, 2000), Danemark (Jensen et coll., 2005), Suède (Akre et coll., 1999 ; Scheike et coll., 2008) et aux États-Unis (Stephen et Chandra, 2006).

Aux États-Unis, le *National Center for Health Statistics* réalise périodiquement des études sur la structure des familles et l'ensemble des facteurs permettant de décrire et comprendre les évolutions dans la fécondité du pays (*National Fertility Survey*, à partir de 1965 et *National Survey of Family Growth*[4] , à compter de 1973). À partir des données des études de 1965, 1976, 1982, 1988, 1995 et 2002, réalisées auprès d'échantillons représentatifs de femmes de 15 à 44 ans, la fréquence de l'infécondité involontaire de 12 mois ou plus chez les femmes mariées de 15 à 44 ans a été estimée (Stephen et Chandra, 2006). Cette fréquence était obtenue en rapportant le nombre de femmes mariées et sexuellement actives qui, au moment de l'étude, n'utilisaient pas de méthode permettant d'éviter une grossesse depuis 12 mois ou plus, au nombre total de femmes mariées de 15 à 44 ans lors de l'étude, qu'elles recherchent ou non une grossesse. Elle diminuait au cours du temps, passant de 11 % en 1965 à 7 % en 2002. L'interprétation de cette étude, très discutée, est délicate, car l'indicateur utilisé est complexe (complexité qui ne semble pas avoir été prise en compte dans le traitement des données) et ne permet pas de s'affranchir d'évolutions dans la structure socio-démographique ou les intentions de fécondité des familles. À titre d'illustration, cet indicateur ne comptabilise pas les couples ayant souffert d'infécondité involontaire de 12 mois ou plus avant l'étude, mais qui auraient conçu à la suite d'un traitement peu avant l'étude (Guzick et Swan, 2006). À partir de la même étude, une augmentation des troubles de la fertilité entre 1982 (10,8 % des femmes mariées de 15 à 44 ans) et 1995 (12,9 % des femmes mariées de 15 à 44 ans) avait également été décrite. Les troubles de la fertilité, dans cette nouvelle étude, correspondait à une stérilité non acquise chirurgicalement, à l'existence d'un antécédent de difficulté à concevoir, ou à l'absence de conception durant les 36 mois précédant l'étude, en l'absence de méthode permettant d'éviter une grossesse (Chandra et Stephen, 1998). Ceci illustre l'importance des aspects méthodologiques dans ce type d'étude.

Les données européennes sur la question sont limitées. À partir d'un échantillon de 1 540 foyers recrutés et interrogés en 1996 et représentatifs des foyers du Royaume-Uni, Joffe (2000) a cherché à décrire des tendances temporelles dans le délai pour concevoir une grossesse. L'échantillon concernait 894

4. Voir http://www.cdc.gov/nchs/nsfg/about_nsfg.htm

femmes et 646 hommes âgés de 16 à 59 ans lors de l'étude, qui ont décrit le délai nécessaire pour concevoir leur première grossesse, survenue entre 1961 et 1993. Contrairement à l'hypothèse initiale de l'auteur, ce délai avait tendance à diminuer avec l'année de début de recherche de la grossesse, que ce soit pour les tentatives de grossesse rapportées par les femmes ou celles rapportées par les hommes. Dans une autre étude rétrospective auprès de jumeaux danois nés entre 1931 et 1952, aucune tendance à la détérioration de la fertilité des couples au cours du temps n'a été rapportée pour les tentatives de grossesse débutées entre 1948 et 1977 (Jensen et coll., 2005). Les couples avaient été interrogés en 1997. Enfin, des données suédoises sur le délai nécessaire pour concevoir ont été recueillies de façon systématique lors de la première visite anténatale à partir de 1982. Ces données ont été analysées par une première équipe (Akre et coll., 1999), qui n'a pas pris en compte le biais potentiel lié à des problèmes de troncature, qui induit une sous-représentation des délais de conception longs en début de période d'étude, et une sur-représentation des délais de conception courts en fin de période d'étude (Jensen et coll., 2000). Ces données ont été réanalysées par l'équipe du département de biostatistique de l'Université de Copenhague, qui a corrigé l'impact potentiel de ce biais (Scheike et coll., 2008). L'analyse indique une tendance générale à la diminution de la fréquence de l'hypofertilité (délai pour concevoir supérieur à un an) sur la période 1982-2000, avec une possible augmentation durant la période 1988-1993 (Scheike et coll., 2008). Seules les études auprès des jumeaux danois et aux États-Unis avaient cherché à prendre en compte les couples ayant eu une tentative de grossesse infructueuse. Il faut également noter qu'à part l'étude réalisée en Suède (Scheike et coll., 2008) où le recueil de l'information a eu lieu en début de grossesse, les données sur le délai pour concevoir ont été obtenues après la grossesse éventuelle, souvent avec plusieurs dizaines d'années de décalage, et avec un intervalle de mémorisation plus long pour les tentatives de grossesse anciennes, par rapport aux plus récentes.

Études rétrospectives sur la fertilité des couples : données en France

En France, différentes études démographiques ont été réalisées, en utilisant un indicateur d'infertilité ressentie. Il s'agissait de l'existence de tentatives de grossesses infructueuses, ou de tentatives de grossesse ayant abouti, mais au bout d'un délai plus long que la femme ne l'aurait souhaité, et dont la fréquence a été décrite dans trois études réalisées à partir d'un échantillon représentatif de femmes de moins de 44 ans en 1978, 1988 et 1994 (Leridon, 2007). La proportion de femmes déclarant une incapacité à concevoir, rapportée au nombre de femmes ayant recherché une grossesse, était de 3,6 % en 1978 ; ce taux était de 6,3 % en 1988 et de 11,9 % en 1994. La proportion de

femmes déclarant une difficulté à concevoir était de 14,6 % en 1978, de 24,8 % en 1988 et de 23,3 % en 1994 (repris par Leridon, 2007). Ces augmentations temporelles sont difficiles à interpréter du fait de la nature subjective de l'indicateur mesuré : il est en effet possible qu'avec le temps, et la médiatisation croissante des troubles de la fertilité et de leurs traitements médicaux, les couples soient de plus en plus impatients dans l'obtention d'une grossesse ou, symétriquement, de moins en moins résignés, et donc de plus en plus enclins à décrire une tentative de grossesse comme trop longue dans les années 1990, par rapport aux couples qui recherchaient une grossesse dans les années 1970. La part des facteurs biologiques, sociétaux et psychologiques est donc très difficile à faire avec de telles approches (Leridon, 1991).

Impact possible des modifications de la qualité du sperme sur la fertilité

La question de l'évolution de la fertilité des couples a aussi été abordée de façon plus indirecte, à l'aide d'une approche reposant sur des simulations statistiques, qui peuvent se révéler très informatives à partir du moment où les hypothèses de départ sont suffisamment précises. Un des enjeux est de partir d'une hypothèse réaliste en termes de détérioration temporelle de la distribution de la concentration spermatique dans la population. En effet, l'existence de la relation non linéaire entre concentration spermatique et probabilité de grossesse (Slama et coll., 2002) fait que, pour une même diminution de la concentration moyenne de la concentration spermatique dans la population, l'impact sur la fécondabilité risque d'être différent selon que cette diminution de la moyenne soit obtenue par une diminution homogène chez tous les hommes (par exemple, de 50 %), ou par une diminution importante (–80 % par exemple) chez les hommes partant d'une concentration élevée et par une diminution relativement plus faible (–20 % par exemple) chez ceux partant d'une concentration plus basse. Pour construire un tel déclin réaliste, les données recueillies au Cecos du Kremlin-Bicêtre publiées par Auger et coll. (1995) ont été utilisées. Ces données couvraient une période d'environ 15 ans, et l'approche statistique a permis de décrire un déclin hypothétique sur une période de 45 ans, proche de la période d'environ 50 ans de l'étude de Carlsen et coll. (1992). L'amplitude du déclin simulé correspondait à une diminution de 47 % de la concentration spermatique médiane en 45 ans. L'application de la fonction de poids permettant de simuler le déclin à la cohorte des *First Pregnancy Planners* danois, qui constitue une des rares études sur le délai pour concevoir dont le recrutement ne se restreignait pas à des couples obtenant finalement une grossesse, a permis d'estimer les conséquences du déclin sur la fécondabilité des couples. Cette diminution de la concentration spermatique de 47 % en médiane était susceptible d'entraîner une diminution de 15 % de la fécondabilité des couples (Slama et coll., 2004).

La fécondabilité ne représentant que la probabilité mensuelle de grossesse, il était nécessaire de traduire cette variation de la fécondabilité de façon plus parlante en termes démographiques ou de santé publique. Ceci a été fait à l'aide d'un modèle démographique développé par Henri Leridon (Leridon et Slama, 2008). Ce modèle démographique simule de façon très réaliste l'ensemble de la vie reproductive d'une cohorte de sujets, en prenant en compte la distribution de l'âge lors des tentatives de grossesse, l'évolution avec l'âge de la fertilité et du risque de fausse-couche spontanée, le temps mort post-partum... Une diminution de 15 % de la fécondabilité a été implémentée dans cette population (dont les caractéristiques de fécondité de départ étaient proches de celles de la population vivant en France en 2000) en faisant différentes hypothèses sur la façon dont cette diminution de la fécondabilité concernait la population. Le déclin pouvait être soit homogène (même diminution relative pour tous les couples), soit hétérogène (la diminution de la fécondabilité n'affectait que les couples partant d'une valeur inférieure à 0,20). Dans tous les cas, le déclin de 15 % de la fécondabilité avait un impact très limité sur la fécondité des couples, c'est-à-dire la taille de leur descendance finale, voisine de 2 enfants par femme. En revanche, l'impact était plus notable sur l'autre face de la question, c'est-à-dire la proportion de couples souffrant d'infécondité involontaire. Selon l'hypothèse faite sur l'homogénéité de la variation de la fécondabilité dans la population, la diminution de 15 % dans la fécondabilité était susceptible d'entraîner une augmentation de la proportion de couples involontairement inféconds durant 12 mois allant de 17 à 53 % ; la proportion de couples avec moins d'enfants qu'ils ne le souhaitaient augmentait entre 5 et 23 %, alors que la proportion de couples éligibles pour une assistance médicale à la procréation augmentait de 14 à 73 % (tableau 3.I).

Tableau 3.I : Effet d'une diminution de la fécondabilité de 7 ou 15 % sur différentes caractéristiques de la population générale, à partir d'un modèle démographique (Leridon et Slama, 2008) (taux initial de fertilité : 2)

	Pop initiale	Changement relatif en fécondabilité							
		Diminution de 7 %				Diminution de 15 %			
		Diminution homogène		Diminution hétérogène		Diminution homogène		Diminution hétérogène	
			Variation (%)		Variation (%)		Variation (%)		Variation (%)
Fécondabilité moyenne	0,231	0,215	- 6,9	0,214	- 7,4	0,197	- 14,7	0,19	- 15,2
Âge moyen de maternité	29,2	29,2	0,0	29,3	0,3	29,2	0,0	29,5	1,0
Nombre final moyen d'enfants	2,00	1,98	- 0,8	1,98	- 0,8	1,96	- 2,0	1,92	- 4,1

	Pop initiale	Changement relatif en fécondabilité							
		Diminution de 7 %				Diminution de 15 %			
		Diminution homogène		Diminution hétérogène		Diminution homogène		Diminution hétérogène	
			Variation (%)		Variation (%)		Variation (%)		Variation (%)
Temps moyen à concevoir (mois)	9,6	10,0	4,2	10,5	9,4	10,7	11,5	14,5	51,0
TTC moyen >1 an (pour 100 1res naissances)	20,5	21,8	6,3	24,0	17,1	23,9	16,6	31,4	53,2
Infertile après 5 ans (pour 100 mariages)	6,7	7,1	6,0	7,1	6,0	7,5	11,9	10,3	53,7
Couples sans enfants (%)	11,7	11,9	1,7	11,9	1,7	12,2	4,3	12,8	9,4
Couples sans enfants involontairement (%)	9,9	10,0	1,0	10,0	1,0	10,2	3,0	10,8	9,1
Couples avec moins d'enfants que voulus (%)	14,9	15,1	1,3	15,1	1,3	15,7	5,4	18,3	22,8
Couples éligibles pour assistance médicale à la procréation (%)	11,6	12,2	5,2	12,6	8,6	13,2	13,8	20,1	73,3
Couples avec plus d'enfants que voulus (%)	15,8	14,5	- 8,2	14,5	- 8,2	13,5	- 14,6	13,0	- 17,7
Naissances non planifiées (pour 100 naissances)	15,5	14,4	- 7,1	14,4	- 7,1	13,3	- 14,2	13,6	- 12,3

TTC : temps moyen à concevoir

Si la détérioration temporelle de certaines caractéristiques spermatiques dans certaines régions des pays industrialisés semble plausible, aucune conclusion forte concernant l'évolution temporelle de la fertilité des couples au cours des dernières décennies dans les pays industrialisés ne peut être apportée. Les quelques études ayant reposé sur des indicateurs tels que la fécondabilité (estimée à partir du délai nécessaire pour concevoir), et qui avaient souvent des limitations méthodologiques, n'indiquent pas de détérioration temporelle de la fertilité des couples dans certaines zones de la Suède, du Danemark ou du Royaume-Uni. Des travaux plus indirects indiquent que, en supposant qu'il y a bien eu une détérioration de la concentration spermatique avec l'amplitude correspondant à une diminution de la médiane d'environ 50 % en 50 ans, et en supposant qu'aucune autre caractéristique de fertilité (féminine notamment) n'a évolué durant la même période, cette détérioration des caractéristiques spermatiques aurait pu avoir un impact sur la proportion de couples

souffrant d'infécondité involontaire ou éligibles pour une assistance médicale à la procréation. Ces travaux reposant sur des approches différentes ne sont pas contradictoires (ils pourraient par exemple être expliqués par une amélioration de la composante féminine de la fertilité, qui compenserait l'éventuelle détérioration du volet masculin de la fertilité). Dans l'ensemble, ils ne permettent pas d'apporter de conclusion forte concernant l'évolution temporelle de la fertilité des couples au cours des dernières décennies dans les pays industrialisés. Comme pour les malformations congénitales des organes reproducteurs, l'absence de système de surveillance standardisé en France et dans la plupart des autres pays ne permet pas de répondre précisément à la question de l'existence de tendances temporelles de la fertilité des couples au cours des dernières décennies.

Bibliographie

AKRE O, CNATTINGIUS S, BERGSTROM R, KVIST U, TRICHOPOULOS D, EKBOM A. Human fertility does not decline: evidence from Sweden. *Fertil Steril* 1999, **71** : 1066-1069

AUGER J, KUNSTMANN JM, CZYGLIK F, JOUANNET P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years [see comments]. *N Engl J Med* 1995, **332** : 281-285

BAIRD DD, WILCOX AJ, WEINBERG CR. Use of time to pregnancy to study environmental exposures. *Am J Epidemiol* 1986, **124** : 470-480

BONDE JP, HJOLLUNDNHKOLSTAD HA, ABELL A, LARSEN SB. Environmental semen studies--is infertility increased by a decline in sperm count? Scand J Work *Environ Health* 1999, **25** (Suppl 1) : 12-16

CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N, SKAKKEBAEK NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* 1992, **305** : 609-613

CHANDRA A, STEPHEN EH. Impaired fecundity in the United States: 1982-1995. *Fam Plann Perspect* 1998, **30** : 34-42

GINI C. Premières recherches sur la fécondabilité des femmes. Presented at Proceedings of the International Mathematical Congress, Toronto 1924

GUZICK DS, SWAN S. The decline of infertility: apparent or real? *Fertil Steril* 2006, **86** : 524-526, discussion 34

JENSEN TK, CARLSEN E, JORGENSEN N, BERTHELSEN JG, KEIDING N, et coll. Poor semen quality may contribute to recent decline in fertility rates. *Hum Reprod* 2002, **17** : 1437-1440

JENSEN TK, JOFFE M, SCHEIKE T, SKYTTHE A, GAIST D, CHRISTENSEN K. Time trends in waiting time to pregnancy among Danish twins. *Hum Reprod* 2005, **20** : 955-964

JENSEN TK, KEIDING N, SCHEIKE T, SLAMA R, SPIRA A. Declining human fertility? [letter; comment]. *Fertil Steril* 2000,**73** : 421-423

JOFFE M, KEY J, BEST N, KEIDING N, SCHEIKE T, JENSEN TK. Studying time to pregnancy by use of a retrospective design. *Am J Epidemiol* 2005, **162** : 115-124

JOFFE M. Time trends in biological fertility in Britain [see comments]. *Lancet* 2000, **355** : 1961-1965

JOFFE M. What has happened to human fertility? *Hum Reprod* 2009, **20** : 523-524

LERIDON H, SLAMA R. The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Hum Reprod* 2008, **23** : 1312-1319

LERIDON H. Aspects biométriques de la fécondité humaine. Paris: Presses Universitaires de France, 1973

LERIDON H. Stérilité et hypofertilité : du silence à l'impatience ? *Population* 1991, **2** : 227-248

LERIDON H. Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology. *C R Biol* 2007, **330** : 339-346

SALLMEN M. Exposure to lead and male fertility. *Int J Occup Med Environ Health* 2001, **14** : 219-222

SCHEIKE TH, RYLANDER L, CARSTENSEN L, KEIDING N, JENSEN TK, et coll. Time trends in human fecundability in Sweden. *Epidemiology* 2008, **19** : 191-196

SCHWARTZ D, MAYAUX MJ. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. Federation CECOS. *N Engl J Med* 1982, **306** : 404-406

SLAMA R, EUSTACHE F, DUCOT B, JENSEN TK, JØRGENSEN N, HORTE A, et coll. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002, **17** : 503-515

SLAMA R, KOLD-JENSEN T, SCHEIKE T, DUCOT B, SPIRA A, KEIDING N. How would a decline in sperm concentration over time influence the probability of pregnancy? *Epidemiology* 2004, **15** : 458-465

STEPHEN EH, CHANDRA A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertil Steril* 2006, **86** : 516-523

4
Âge de la puberté

Une diminution particulièrement importante de l'âge des premières règles est observée dans la plupart des pays occidentaux. Cependant, la variabilité interindividuelle peut atteindre 4-5 ans et dépend de facteurs génétiques et environnementaux et probablement des interactions entre ces deux types de facteurs. Ce chapitre s'appuie sur les données de l'expertise collective Inserm « Croissance et puberté « (Inserm, 2007).

Une meilleure compréhension des liens entre l'initiation de la puberté, les facteurs d'environnement et la survenue de maladies touchant la croissance et/ou la maturation sexuelle passe nécessairement par la mise en place d'études épidémiologiques longitudinales à grande échelle comprenant une approche clinique, biologique et génétique.

Le développement de nouveaux modèles d'étude des anomalies de la croissance et de la différenciation sexuelle (en particulier modèles animaux génétiquement modifiés et/ou exposés à divers facteurs d'environnements à différents stades du développement) devrait permettre de tester plusieurs hypothèses concernant la régulation de ces fonctions physiologiques importantes.

Développement pubertaire

La puberté correspond à l'activation de la fonction hypothalamo-hypophyso-gonadique, aboutissant au développement complet des caractères sexuels, à l'acquisition de la taille définitive, de la fonction de reproduction et de la fertilité. Les différents stades du développement pubertaire sont définis selon la classification de Tanner portant sur les caractères sexuels secondaires (tableau 4.I).

Tableau 4.I : Classification de Tanner des stades de développement pubertaire

Stades de développement pubertaire
Pilosité pubienne garçons et filles
P1 Absence de pilosité
P2 Quelques poils longs sur le pubis
P3 Pilosité pubienne au-dessus de la symphyse
P4 Pilosité pubienne fournie
P5 La pilosité s'étend à la racine des cuisses et s'allonge vers l'ombilic chez le garçon
Développement mammaire
S1 ou B1 Absence de développement mammaire
S2 ou B2 Petit bourgeon mammaire avec élargissement de l'aréole
S3 ou B3 La glande mammaire dépasse la surface de l'aréole
S4 ou B4 Développement maximum du sein (apparition d'un sillon sous-mammaire), saillie de l'aréole et du mamelon sur la glande
S5 ou B5 Aspects adulte, disparition de la saillie de l'aréole
Développement des organes génitaux externes du garçon
G1 Testicules et verge de taille infantile
G2 Augmentation du volume testiculaire de 4 à 6 ml (L 25 à 30 mm)
G3 Continuation de l'accroissement testiculaire de 6 à 12 ml (L 30-40 mm), accroissement de la verge
G4 Accroissement testiculaire de 12 à 16 ml (L 40-50 mm) et de la verge
G5 Morphologie adulte

Chez la fille, la première manifestation pubertaire est le développement des glandes mammaires qui commence en moyenne à partir de 10,5/11 ans. Viennent ensuite le développement de la pilosité pubienne et axillaire, les modifications de la vulve et enfin les premières règles (ménarche) qui apparaissent en moyenne autour de 13 ans, entre 2 et 2,5 ans après l'apparition des premiers signes pubertaires. Leur date de survenue est considérée comme physiologique entre 10 et 15,5 ans. La puberté chez la fille se situe pour un âge osseux de 11 ans (10 à 12 ans) correspondant à l'apparition du sésamoïde du pouce.

Chez le garçon, le premier signe de puberté est l'augmentation du volume testiculaire qui se produit en moyenne vers l'âge de 12-13 ans. Les autres signes de maturation pubertaires sont le développement de la pilosité pubienne et axillaire, l'augmentation de la taille de la verge. La puberté chez le garçon se situe pour un âge osseux de 13 ans correspondant à l'apparition du sésamoïde du pouce.

En Europe, l'âge des premières règles est en moyenne à 12 ans en Italie, 12,6 ans en France et 13,5 ans en Allemagne. Concernant les garçons, différentes études américaines et européennes s'accordent sur un âge moyen de 11,6 ans pour le stade G2.

Tendances séculaires

Entre le milieu du 19e siècle et le milieu du 20e siècle, l'âge moyen des premières règles a particulièrement diminué, passant de 17 ans à 14 ans aux États-Unis et dans plusieurs pays de l'Europe de l'Ouest. Cependant, la courbe de cette évolution varie d'un pays à l'autre : une diminution de 0,3 ans par décennie a été calculée pour les données norvégiennes et finlandaises et dans les études prospectives américaines (figure 4.1). En France, la diminution est estimée à 0,175 an par décennie.

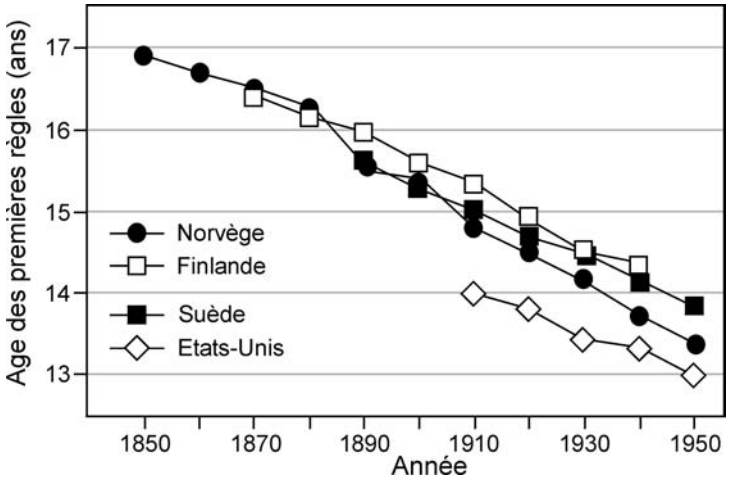


Figure 4.1 : Évolution séculaire de l'âge des premières règles dans 4 pays

Il faut noter l'existence d'un gradient Nord-Sud au 19e siècle avec un âge de ménarche plus bas dans les pays du sud de l'Europe (France) que dans les pays du nord (Scandinavie). Mais, les études réalisées après 1960 dans ces pays tendent à montrer, une stabilisation voire un arrêt de la diminution de l'âge de la puberté. Cependant, dans d'autres pays (Inde, Chine, Bulgarie) la diminution est aussi importante qu'elle l'était dans les pays occidentaux avant 1960. Ces évolutions sont en concordance avec l'évolution des conditions de vie dans les différents pays. L'évolution séculaire de l'âge des premières règles serait associée à l'élévation de l'indice de masse corporelle.

Des études se sont intéressées à l'évolution séculaire de marqueurs tels que le développement mammaire (filles) ou des organes génitaux (garçons). En Suède et en Grande-Bretagne, le développement mammaire est plus précoce en 1980 que dans les années 1960 ou 1970. Ces données soulignent d'une part l'existence de variations d'un pays à l'autre et d'autre part montrent l'importance du marqueur utilisé pour évaluer l'évolution de l'âge de la puberté (ménarche, différents stades de Tanner).

Les études épidémiologiques ont tenté d'isoler différents facteurs corrélés avec des variations de l'âge de la puberté, essentiellement chez les filles. Les filles vivant dans des milieux dits « privilégiés » au sein de pays en voie de développement (Asie, Afrique, Amérique du sud) ont un âge moyen de la ménarche comparable à celui des filles des pays occidentaux du pourtour méditerranéen mais différent de celui des filles vivant dans les mêmes pays dans des conditions moins privilégiées. Ceci indique bien l'influence des conditions socio-économiques. Une relation entre le poids corporel et l'âge de survenue de la puberté a été suggérée par différentes études. Les filles qui ont une puberté précoce sont plus souvent obèses que les filles qui ont une puberté tardive alors que l'inverse est observé chez les garçons. Un indice de masse corporelle élevé dès 36 mois est associé avec une puberté précoce chez les filles américaines.

Des situations de stress physique et psychologique peuvent entraîner un retard pubertaire et un renversement de la tendance séculaire comme cela a été observé en temps de guerre en Croatie et en Bosnie. Cependant, d'autres situations de stress peuvent à l'inverse induire une puberté précoce (immigration, adoption, défaut d'attachement parental). La différence d'impact des composants de la situation de stress suggère une hétérogénéité de la réponse neuroendocrine à ces différents facteurs.

De nombreuses études se sont intéressées aux relations entre l'exposition fœtale et périnatale à des produits chimiques perturbateurs endocriniens (pesticides, DDT) et la puberté précoce. Mais, il est difficile d'isoler les agents chimiques présents dans l'environnement pour connaître leurs effets respectifs sur le système endocrinien.

Au total, l'âge de la puberté est un processus physiologique complexe soumis à tout un spectre de facteurs corrélés (figure 4.2).

La littérature concernant les relations entre obésité et puberté indique clairement, chez les filles, l'existence d'une corrélation positive entre surcharge pondérale et maturation sexuelle précoce. La difficulté à déterminer le sens de la relation entre surcharge adipeuse et maturation sexuelle suggère qu'il s'agit d'une relation bidirectionnelle, dans laquelle l'accumulation de graisse au moment de la puberté pourrait dépendre des hormones sexuelles (les niveaux d'œstrogènes), mais la quantité de graisse accumulée pourrait elle-même précipiter la maturation sexuelle.

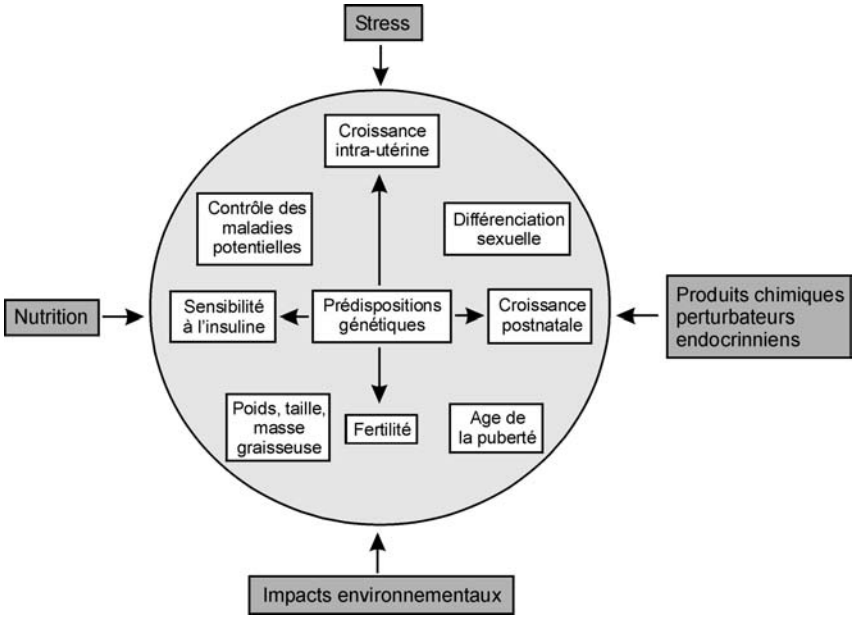


Figure 4.2 : Facteurs génétiques et environnementaux influençant l'âge de la puberté (d'après Parent et coll., 2003)

Bibliographie

INSERM. Croissance et puberté : Évolutions séculaires, facteurs environnementaux et génétiques. Collection Expertise Collective, Éditions Inserm, 2007

PARENT AS, TEILMANN G, JUUL A, SKAKKEBAEK NE, TOPPARI J, BOURGUIGNON JP. 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** : 668-693

5
Cancers du testicule, de la prostate, du sein et de l'ovaire

On assiste depuis une vingtaine d'années à une augmentation de l'incidence de certains cancers, en particulier les cancers du testicule, de la prostate, du sein et de l'ovaire. Cette augmentation, observée au niveau mondial mais avec des variations géographiques, pose la question d'un lien entre la survenue de ces cancers et des facteurs environnementaux à identifier. Ce chapitre reprend les données de l'expertise « Cancer et environnement » (Inserm, 2008), réactualisées selon les projections de l'InVS pour l'année 2010 (Hospices civils de Lyon et coll., 2010).

Cancer du testicule

Les tumeurs du testicule sont dans l'ensemble des tumeurs relativement rares. Cependant, leur incidence est en augmentation depuis plus de 50 ans dans la plupart des pays industrialisés. Il s'agit des tumeurs les plus fréquentes chez l'homme âgé de 20 à 35 ans. Les progrès thérapeutiques majeurs réalisés au cours des 30 dernières années ont permis de diminuer considérablement la mortalité.

Le pic d'incidence se situe entre 25 et 35 ans. Il est très rare avant 15 ans comme après 50 ans. L'âge de survenue présente cependant des variations en fonction du type histologique. Les tumeurs germinales du testicule non séminomateuses sont pratiquement toujours des tumeurs de l'adulte jeune (âge médian au diagnostic, 30 ans), alors que les tumeurs germinales du testicule séminomateuses peuvent parfois s'observer après la cinquantaine (âge médian au diagnostic, 38 ans).

La plupart des cancers du testicule ont pour origine les cellules germinales. Les tumeurs séminomateuses représentent 30 à 40 % des tumeurs germinales du testicule. Les tumeurs non séminomateuses représentent 60 à 70 % des tumeurs germinales du testicule. Il existe de nombreuses formes de tumeurs non germinales. Les deux principales sont le lymphome testiculaire et la tumeur à cellules de Leydig.

Incidence dans le monde

L'incidence des cancers du testicule n'est pas la même dans les différentes régions du monde, elle varie aussi en fonction de l'origine ethnique des populations. L'Australie, l'Amérique du Nord et surtout l'Europe présentent les taux les plus élevés (généralement supérieurs à 4/100 000, standardisés sur la population mondiale) (Parkin et coll., 2002). En Asie, Amérique du sud et Afrique, les taux sont généralement inférieurs à 2/100 000. Lorsque l'origine ethnique des populations est prise en compte, on observe les taux les plus élevés dans les populations blanches. Aux États-Unis, l'incidence est 3 à 4 fois plus faible chez les noirs et les asiatiques que chez les blancs et 2 fois plus faible chez les hispaniques (Ries et coll., 2007).

La carte de l'Europe (figure 5.1 ; Huyghe et coll., 2007) permet de mettre en avant la grande disparité dans les taux d'incidence du cancer du testicule entre les pays européens ainsi que les différences dans l'augmentation de l'incidence. D'après les données les plus récentes de Globocan 2008[5] , l'incidence atteint 12,1 pour 100 000 en Norvège, 10,3 au Danemark, 6,1 en Suède et 5,1 en Finlande, montrant des différences importantes entre pays voisins.

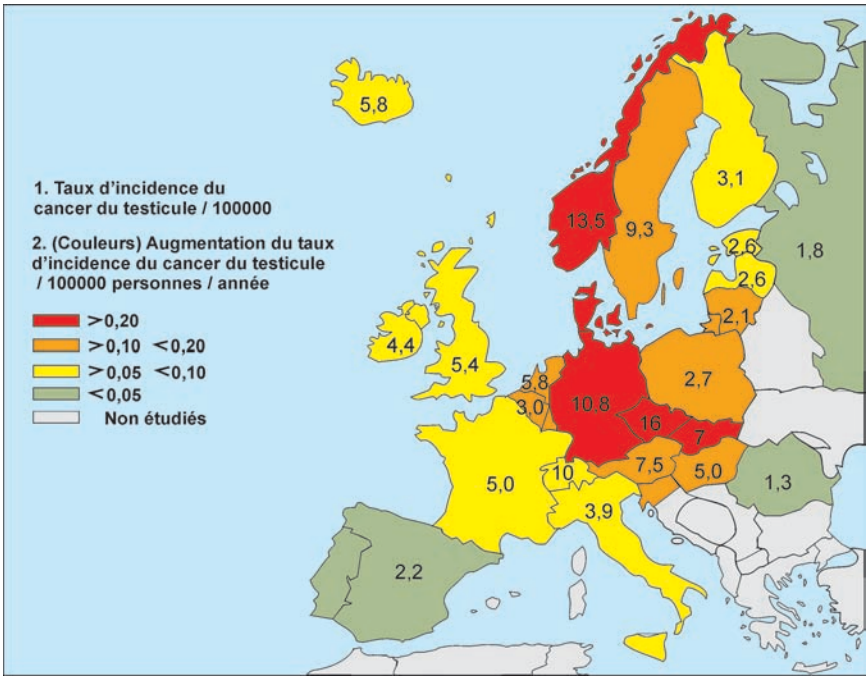


Figure 5.1 : Carte de l'Europe montrant les taux d'incidence du cancer du testicule et leur augmentation moyenne annuelle (d'après Huyghe et coll., 2007)

5. Globocan 2008 est la base statistique mondiale des cancers du CIRC (Centre international de Recherche sur le Cancer) consultable à : http://globocan.iarc.fr/

Incidence en France

En France, en 2005, le taux d'incidence pour l'ensemble des cancers du testicule était de 6,4 pour 100 000 (Belot et coll., 2008).

Les estimations les plus récentes (Hospice civils de Lyon et coll., 2010) sont des projections pour 2010, calculées à partir des données de 2005 et qui font l'hypothèse que la tendance récente à l'augmentation se prolonge (les 5 dernières années). Le taux d'incidence en 2010 est estimé à 7,0 cas pour 100 000 personnes-années (soit 2 220 nouveaux cas)[6].

Concernant le taux d'incidence du cancer du testicule par type histologique, une récente étude menée dans le sud de la France montre que le taux pour les tumeurs séminomateuses était de 1,24 pour 100 000 et de 1,80 pour 100 000 pour les tumeurs non séminomateuses, pour la période 1995-1999 (Walschaerts et coll., 2008).

Les taux d'incidence observés dans les registres français sont très différents d'un département à l'autre. Il existe un gradient nord-sud et est-ouest, les taux les plus hauts se trouvant en Alsace (Haut-Rhin et Bas-Rhin). Ces taux varient du simple au double et le Bas-Rhin avec un taux d'incidence de 8,7/100 000 personnes-année[7], approche les taux très élevés que l'on trouve en Europe du Nord.

Actuellement, la mortalité par cancer du testicule est très faible : le taux standardisé sur la population mondiale est de 0,25 pour 100 000 (Remontet et coll., 2003a et b).

Tendances de l'incidence

L'incidence du cancer du testicule est en augmentation depuis plus de 50 ans dans la plupart des pays industrialisés. Cette augmentation varie d'un pays à l'autre, tout en étant moins hétérogène que les taux d'incidence eux-mêmes d'une région à l'autre. En Roumanie, on observe une augmentation annuelle pour 100 000 qui est inférieur à 0,05 alors qu'elle atteint plus de 0,20 en Norvège. Mais l'augmentation de l'incidence pour la majorité des pays européens se situe entre 0,10 et 0,20 pour 100 000 par an, conduisant à un doublement de l'incidence depuis 1970.

Toutefois, plusieurs auteurs en conduisant des analyses par cohorte sur des données de registres d'Europe du Nord observent une baisse du risque pour les sujets nés autour de la seconde guerre mondiale (Møller, 1993 ; Bergström et coll., 1996).

L'analyse des données du registre du Connecticut et plus largement de l'ensemble des registres du *SEER Program* (*Surveillance, Epidemiology, and End*

6. Estimation 2010 disponibles sur le site de l'InVS (http://www.invs.sante.fr/)
7. http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/francim7807/default.htm

Results)[8] montre une augmentation nette chez les blancs alors qu'il n'existe pas d'augmentation significative chez les noirs américains (Zheng et coll., 1996 ; Ries et coll., 2007).

Comme pour le reste du monde, l'incidence du cancer du testicule est en très forte augmentation en France. En France, l'incidence est passée de 3,17 en 1978 à 4,82 pour 100 000 en 2000, à 6,4 pour 100 000 en 2005, soit une augmentation de 2,5 % sur la période 1980-2005 (3,4 cas pour 100 000 personnes-années en 1980 contre 6,4 cas en 2005). Cette augmentation est relativement constante sur l'ensemble de la période (figure 5.2).

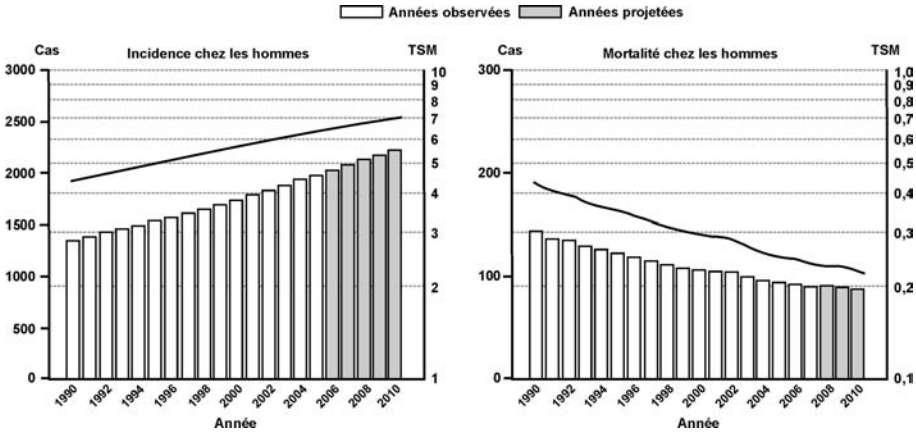


Figure 5.2 : Évolution de l'incidence (taux standardisés monde) et de la mortalité du cancer du testicule chez l'homme de 1990 à 2010 en France (d'après Hospices civils de Lyon et coll., 2010)

Les estimations pour 2010 sont des projections. Toute projection présente un certain niveau d'incertitude, notamment parce qu'elle oblige à faire certaines hypothèses sur ce qui s'est passé entre 2005 et 2010, période sur laquelle les données ne sont pas encore disponibles.

Cependant si les séminomes n'ont cessé d'augmenter pour toutes les cohortes de naissances, l'évolution des tumeurs non séminomateuses est moins régulière.

Entre 1978 et 2000, le taux pour les séminomes est passé de 1,50 à 2,46 pour 100 000, soit une augmentation par an de 2,4 %, et de 1,18 à 1,95 pour 100 000 pour les tumeurs non séminomateuses, soit 2,4 % d'augmentation annuelle (Hedelin et Remontet, 2002). Une étude plus récente a montré que le taux pour les séminomes est passé de 0,66 à 1,24 pour 100 000, et pour les non séminomes, de 0,66 à 1,80 pour 100 000 entre 1980-84 et 1995-99 (Walschaerts et coll., 2008). Toutefois, les fluctuations dans les incidences au cours du temps ne permettent pas de conclure à une disparité selon le type histologique. C'est également le cas pour d'autres pays. Par exemple, aux États-Unis, dans la population blanche, bien que le taux d'incidence pour les

8. http://seer.cancer.gov/faststats/sites.php

séminomes augmente plus vite durant les 3 premiers intervalles de temps, il atteint un plateau, et aucune différence n'est observée entre les types histologiques pour la population noire (McGlynn et coll., 2003).

Concernant les tendances de l'incidence pour l'ensemble des tumeurs, bien que les taux observés dans les différents registres soient hétérogènes, il existe un même phénomène : un doublement de l'augmentation de tous ces taux, que ce soit en France ou dans les pays européens, sur les 20 dernières années.

Dans le sud de la France, le taux d'incidence du cancer du testicule est passé de 1,27 à 3,04 pour 100 000 entre 1980 et 1999 (Walschaerts et coll., 2008). En Italie, le taux d'incidence a augmenté de 2,3 à 3,9 pour 100 000 entre 1976 et 1995 dans la région de Varèse, et de 2,6 à 4,0 pour 100 000 dans la région de Turin entre 1985 et 1995 (Purdue et coll., 2005). En Finlande, l'incidence est passée d'environ 2,1 à 4,2 pour 100 000 entre 1975 et 1995 (Bray et coll., 2006).

Ces observations suggèrent une grande hétérogénéité géographique dans l'incidence mais une relative homogénéité dans les tendances temporelles d'une région à l'autre.

L'incidence a diminué pour les cohortes nées entre les deux guerres mondiales avant d'augmenter en se superposant à celle des séminomes. Cette évolution qui n'est pas expliquée, ne semble pas être un artefact d'enregistrement ou de codage des tumeurs testiculaires (Hedelin et Remontet, 2002).

En étudiant la tendance de l'incidence par un modèle âge-période-cohorte, l'effet cohorte de naissance révèle une diminution du taux d'incidence du cancer du testicule pour les cohortes nées dans les années 1930 et au cours de la seconde guerre mondiale à l'opposé de ce qui est décrit pour les autres périodes de naissance (Walschaerts et coll., 2008). Ce phénomène, également observable dans de nombreux pays européens (Danemark, Suède, Finlande...) ne peut s'expliquer par une meilleure détection des cancers du testicule, ou un meilleur enregistrement car il n'existe pas d'effet période.

Cet « effet de cohorte de naissance » souligne un effet générationnel, c'est-à-dire un changement temporel dans les expositions qui pourraient être à l'origine de la maladie. Etant donné que le pic d'incidence du cancer du testicule survient entre les 20-35 ans, et en considérant qu'il est probable que le cancer du testicule est souvent précédé d'un carcinome *in situ*, qui lui-même aurait son origine dès la vie utérine, il est raisonnable de supposer que ces changements se sont produits au cours de deux fenêtres d'expositions clés : *in utero* et durant la puberté.

Causes possibles des tendances de l'incidence du cancer du testicule

L'augmentation de l'incidence ne peut être due à des évolutions démographiques (il s'agit d'un cancer de l'homme jeune, et les évolutions sont standardisées en supposant que la structure d'âge de la population ne varie pas) ; elle

ne peut non plus être due à des modifications des pratiques de dépistage car il n'existe pas de campagne ou de pratique de dépistage de ce cancer, et les jeunes adultes ne subissent d'examen du testicule qu'en cas de symptômes. Une piste purement génétique semble elle aussi peu probable (malgré l'existence d'un lien dans certaines études entre cancer dans la famille et cancer du testicule) en raison de la rapidité des évolutions temporelles (doublement du risque de développer la maladie entre les hommes nés en France à la fin des années 1930 et ceux nés au début des années 1970 (Slama et coll., 2004). Pour ces raisons, l'exposition à des facteurs environnementaux à l'âge adulte, dans l'enfance ou la vie intra-utérine, est soupçonnée par défaut comme pouvant expliquer ces tendances temporelles en totalité ou partie.

Des études réalisées en milieu professionnel n'ont pas permis, à ce jour, d'identifier des facteurs de risque patents parmi les expositions subies à l'âge adulte (Inserm, 2008). Très peu d'études ont été réalisées sur les expositions durant la période fœtale chez l'homme (Hardell et coll., 2003).

Cependant, l'analyse de la littérature montre que les divers facteurs d'expositions professionnelles, même s'ils peuvent jouer un rôle dans la survenue du cancer du testicule, ne peuvent aucunement expliquer l'augmentation récente et majeure de l'incidence. Si plusieurs hypothèses peuvent être évoquées (modifications de l'alimentation, du mode de vie…), le seul élément tangible et bien documenté à notre disposition reste la relation forte qui existe entre cryptorchidie et cancer du testicule (Mieusset, 1994 ; Mc Glynn, 2001 ; Cook et coll., 2010).

De nombreuses études internationales montrent que cette pathologie malformative est en augmentation suivant en cela une courbe d'incidence assez parallèle à celle du cancer du testicule. La cryptorchidie pourrait contribuer à expliquer une partie des nouveaux cas de cancer du testicule.

Cette hypothèse étiopathogénique amène à concevoir des études plus « en amont » sur le suivi de l'incidence de la cryptorchidie et aussi sur l'identification des facteurs de risque de survenue de cette pathologie malformative. La cryptorchidie est un modèle intéressant dans la mesure où la survenue de l'événement « présence d'une cryptorchidie à la naissance » est très vraisemblablement liée à une modification/perturbation dans la mise en place des divers éléments constitutifs de l'appareil reproductif masculin.

De plus, dans un contexte d'inter-relations probables entre environnements (personnel, domestique ou professionnel) et déroulement de la grossesse, l'identification et la mesure des diverses expositions per-gravidiques (survenues au cours des 9 mois de gestation) pourraient/devraient constituer un champ de recherche pour la cryptorchidie et le cancer du testicule.

Le cancer du testicule, premier cancer de l'homme jeune avec des conséquences majeures en termes de morbidité (infertilité, impact psychologique), constitue un problème émergent de santé publique et un axe de recherche majeur en santé de la reproduction.

Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate touche l'homme de plus de 50 ans. C'est le premier cancer urologique et également le premier cancer chez l'homme en termes d'incidence devant le cancer du poumon dans les pays développés. Il s'agit presque toujours d'un adénocarcinome développé aux dépens des acini. Les autres formes sont rares, de l'ordre de 3 % (Mostofi et coll., 1993).

De multiples altérations sont responsables d'un dérèglement progressif des fonctions cellulaires corrélées au stade, au grade et à l'évolution tumorale. L'expression des gènes androgénodépendants est modifiée.

Incidence dans le monde

Les variations géographiques de l'incidence du cancer de la prostate sont à la fois liées à l'origine ethnique des populations et au niveau économique des pays, qui joue lui-même par plusieurs voies. L'élévation du niveau de vie est associée : à des changements des habitudes de vie qui sont probablement des facteurs de risque (alimentation, exercice physique), à l'allongement de la durée de vie, et surtout à une évolution des moyens diagnostiques qui favorise la mise en évidence de cancers de la prostate de petite taille. On retrouve donc des taux élevés dans les pays développés. À niveau de vie égal, les populations noires d'origine africaine semblent avoir un risque très élevé, les asiatiques un risque faible. En Amérique du Nord, les valeurs moyennes des taux standardisés sont autour de 180/100 000 dans les populations noires et 100/100 000 dans les populations blanches. En Australie, les valeurs moyennes sont autour de 90/100 000. En Europe, les valeurs vont de 100/100 000 dans certaines régions d'Autriche, notamment le Tyrol, à 20/100 000 dans le sud et dans l'est. En Europe du Nord, les taux sont généralement élevés (autour de 75/100 000), mais le Danemark fait exception avec une incidence faible (40/100 000). C'est en Asie que les taux sont les plus bas (valeurs moyennes autour de 15/100 000) (Curado et coll., 2007).

Incidence en France

Avec un peu plus de 40 000 nouveaux cas estimés en 2000, le cancer de la prostate par sa fréquence se situe maintenant au 2e rang de l'ensemble des cancers et au 1er rang pour l'homme chez lequel il représente 25 % de l'ensemble des nouveaux cas (Remontet et coll., 2003a et b). Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 75,3 pour 100 000 en 2000 et est estimé à 121,2/100 000 en 2005.

Les estimations les plus récentes publiées par l'InVS sont des projections pour 2010, calculées à partir des données de 2005 et qui font l'hypothèse d'une stabilisation voire d'une inversion de l'évolution entre 2005 et 2010. Le taux

d'incidence en 2010 est estimé à 128,8 cas pour 100 000 personnes-années (soit 71 577 nouveaux cas)[9] .

L'incidence augmente très rapidement avec l'âge, pour les sujets âgés de 75 ans et plus en 2000, l'incidence dépasse 1 000 pour 100 000. Sur la courbe transversale des taux calculés pour l'année 2000, on observe une légère diminution de l'incidence chez les sujets de plus de 80 ans, correspondant probablement au plus faible risque des sujets appartenant aux cohortes les plus anciennes (Remontet et coll., 2003a et b).

L'incidence du cancer de la prostate en Guadeloupe, et en Martinique (Registre du cancer de Martinique), est plus élevée qu'en France métropolitaine (Mallik et coll., 2005). En effet, la Guadeloupe a une incidence de cancer de la prostate de 168,7 pour 100 000 en 2003 (taux standardisé sur la population mondiale) et la Martinique de 155 pour 100 000 sur la période 1998-2002[10] . Ces chiffres se situent à des niveaux légèrement inférieurs à ceux observés chez les noirs américains (179 pour 100 000 sur la même période dans les 14 registres du SEER *Program*) (Curado et coll., 2007).

Tendances de l'incidence dans le monde

L'évolution de l'incidence du cancer de la prostate est indissociable de l'évolution des techniques diagnostiques et en particulier de la diffusion du dosage de l'antigène prostatique spécifique (PSA). La politique adoptée par un pays vis-à-vis de l'utilisation du PSA et plus généralement par rapport à la prise en charge des cancers prostatiques, retentit directement sur le taux d'incidence de ces cancers. La stratégie très attentiste adoptée par les médecins danois explique la faible incidence observée dans ce pays. Les cas diagnostiqués y sont probablement plus évolués car c'est le pays où l'on observe la survie la plus faible d'Europe de l'Ouest (Post et coll., 1998). Aux États-Unis où le dépistage est recommandé, les résultats du *SEER Program* montrent une augmentation majeure de l'incidence entre 1986 et 1992 (Ries et coll., 2007). Cette augmentation s'observe dans toutes les tranches d'âges. Après 1992, l'incidence a chuté brusquement, de façon très nette chez les plus de 75 ans, moins fortement dans la tranche d'âge 65-74 ans et assez peu chez les moins de 65 ans. La même observation est faite au Canada (Meyer et coll., 1999).

Tendances de l'incidence en France

Pour la France, on observe également une très forte augmentation mais on ne voit pas apparaître de diminution jusqu'en 2004. L'incidence a très fortement

9. Estimation 2010 disponibles sur le site de l'InVS (http://www.invs.sante.fr/)
10. Données consultables à l'adresse suivante : http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers/martinique/

augmenté au cours des deux dernières décennies (figure 5.3). Entre 1975 et 2000, l'augmentation annuelle moyenne du taux est de 5,33 % par an. Le nombre de nouveaux cas diagnostiqués était de 10 856 en 1980, atteignait 40 300 en 2000 et d'après les dernières estimations, 71 577 en 2010.

Il est peu raisonnable d'imaginer que l'augmentation de l'incidence de ces vingt dernières années puisse se poursuivre au même rythme car l'effet de la mise en place du dépistage par le PSA devrait s'atténuer. Il semble au vu des observations faites sur les données d'ALD fournies par les caisses d'assurance maladie que le décrochage ait lieu vers 2005. Une stabilisation voire une inversion de l'évolution entre 2005 et 2010 a été retenue pour réaliser les projections 2010. Pour la mortalité, la baisse récente, confirmée dans de très nombreux pays, a été prise en considération pour les projections (figure 5.3, Hospices civils de Lyon et coll., 2010).

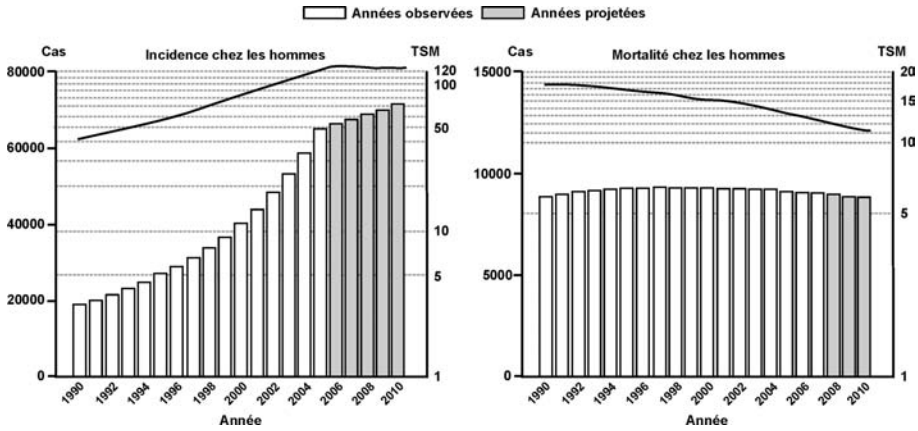


Figure 5.3 : Évolution de l'incidence (taux standardisés monde) et de la mortalité du cancer de la prostate chez l'homme de 1990 à 2010 en France (d'après Hospices civils de Lyon et coll., 2010)

Les estimations pour 2010 sont des projections. Toute projection présente un certain niveau d'incertitude, notamment parce qu'elle oblige à faire certaines hypothèses sur ce qui s'est passé entre 2005 et 2010, période sur laquelle les données ne sont pas encore disponibles.

L'augmentation d'incidence du cancer de la prostate est multifactorielle, en lien probable avec l'âge, l'ethnie et l'alimentation. Le lien avec les expositions professionnelles est difficile à mettre en évidence car il est nécessaire de tenir compte du produit, mais également de la dose utilisée et du temps d'exposition, données de recueil très aléatoire. Des études montrent en Guadeloupe, un risque augmenté de cancer de la prostate en lien avec l'exposition à la chlordécone (Multigner et coll., 2010).

Cancer du sein

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme au niveau mondial, dans les pays d'Europe occidentale et d'Amérique du Nord (Parkin et coll., 2002), ainsi qu'au Japon depuis peu (Minami et coll., 2004). En France, le taux d'incidence de cancer du sein standardisé sur la structure d'âge mondiale est le plus élevé d'Europe. Ce nombre a doublé en 20 ans, partant de 21 000 nouveaux cas en 1980 (Remontet et coll., 2003a et b). Comparativement, le cancer du sein chez l'homme est extrêmement rare.

Le taux d'incidence standardisé sur l'âge est passé de 56,8 à 101,5 pour 100 000 femmes. Si l'augmentation observée au cours des dernières décennies peut être en partie attribuée au développement du dépistage dans les pays industrialisés, la part liée à chacun des facteurs de risque connus ou suspectés est mal définie.

Classiquement on distingue les cancers *in situ* et les cancers infiltrants. Les cancers *in situ* correspondent à une prolifération de cellules malignes sans rupture de la membrane basale, donc ne comportant pas de risque théorique d'envahissement ganglionnaire. Les carcinomes canalaires *in situ* sont les plus fréquents, représentant 15 à 20 % des cancers du sein. Dans les carcinomes infiltrants, la prolifération tumorale dépasse la membrane basale et envahit le conjonctif palléal. La grande majorité des cancers infiltrants sont de type canalaire. Plus récemment, l'utilisation de techniques génomiques à haut débit comme les puces à ADN a permis d'ajouter une caractérisation moléculaire et de confirmer à ce niveau l'hétérogénéité de la maladie. Cinq sous-types majeurs exclusifs de cancers du sein ont été identifiés sur la base de l'expression transcriptionnelle d'environ 500 gènes : luminal A, luminal B, basal, ERBB2 et normal. Elle permet de dégager des groupes de pronostic différent. Les avancées moléculaires et cellulaires, conjointes et cohérentes, font progresser notre connaissance de l'oncogenèse mammaire.

Incidence dans le monde

L'incidence du cancer du sein augmente régulièrement. Le nombre de nouveaux cancers du sein diagnostiqués en 2000 était estimé à plus d'un million, représentant 22 % des cancers de la femme (Parkin et coll., 2001 ; Althuis et coll., 2005). L'incidence de ce cancer varie fortement selon les régions du monde avec un rapport de 1 à 5 entre les pays industrialisés à forte incidence et les pays en voie de développement à faible incidence. Le Centre international de recherche sur le cancer dispose des données d'incidence observée des cancers sur la période 1993-1997 (Parkin et coll., 2002). Les taux d'incidence les plus élevés sont observés aux États-Unis avec 100 cas pour 100 000 femmes, et en Europe de l'Ouest et du Nord. Les taux sont intermédiaires en Europe de l'Est, dans certains pays d'Europe du Sud comme l'Espagne et en Amérique du Sud. Les taux les plus bas se situent en Afrique et en Asie (ils peuvent être inférieurs à 20 pour 100 000) y compris au Japon, pays industrialisé.

Les taux d'incidence, entre 60 et 80/100 000 parmi les populations asiatique, hispanique et noire aux État-Unis, sont intermédiaires entre l'incidence observée dans la population des femmes blanches, qui présentent souvent des taux supérieurs à 100/100 000, et l'incidence peu élevée observée en Asie ou en Afrique.

Incidence en France

En France, le Réseau français des registres de cancers (Francim) estime à 49 814 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en 2005 (www.invs.fr). Comme au niveau mondial et européen, le cancer du sein se situe au 1er rang de tous les cancers féminins. Le taux d'incidence standardisé de 101,5 pour 100 000 femmes est parmi les plus élevés en Europe. Il représente 36 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers chez la femme en France.

Les estimations les plus récentes sont des projections pour 2010, calculées à partir des données de 2005 (Hospice civils de Lyons et coll., 2010). Le taux d'incidence en 2010 est estimé à 100,0 cas pour 100 000 personnes-années (52 588 nouveaux cas)[11] .

La forme de la courbe d'incidence du cancer du sein en fonction de l'âge diffère selon les populations et au cours du temps. Dans la plupart des populations occidentales, l'incidence augmente fortement avec l'âge jusqu'à la survenue de la ménopause qui est alors suivie d'une augmentation de moindre pente (Henderson et coll., 1996). La courbe d'incidence en France pour une même cohorte de naissance (1928) est conforme à cette description. En transversal, c'est-à-dire pour toutes les cohortes de naissance observées à une date donnée (2000), un pic d'incidence est observé entre 60 et 69 ans, suivi d'une diminution du taux d'incidence. Cette diminution résulte d'un risque moindre de cancer du sein dans les cohortes de naissance les plus anciennes.

Ces chiffres d'incidence n'incluent pas les cancers *in situ* qui peuvent représenter entre 5 et 15 % de l'ensemble des cancers du sein selon les départements en France.

Le carcinome canalaire représente la grande majorité (85 %) des formes histologiques du cancer du sein en France.

Évolution de l'incidence dans le monde

L'incidence a augmenté régulièrement dans la plupart des régions du monde (Bray et coll., 2004). L'évolution de l'incidence en fonction de l'âge est complexe à décrire.

La hausse, en moyenne de 20 à 40 % entre 1973-1977 et 1993-1997, a été plus marquée notamment dans les pays avec un taux d'incidence initial plus bas

11. Estimation 2010 disponibles sur le site de l'InVS (http://www.invs.sante.fr/)

comme au Japon, en Finlande ou dans les pays en voie de développement (Althuis et coll., 2005). En Europe, tous les pays ont présenté une augmentation d'incidence, les taux moyens de variation étaient compris entre 1,2 % par an en Suisse et 3 % en République Tchèque sur la période 1985-1997 (Botha et coll., 2003). Les taux d'évolution étaient plus élevés dans la tranche d'âge des femmes soumises à un dépistage. Un fait récent marquant est l'inversion de tendance aux États-Unis, où une diminution de l'incidence est observée depuis le début des années 2000 parmi les femmes de plus de 45-50 ans (Jemal et coll., 2007 ; Ravdin et coll., 2007 ; Ries et coll., 2007).

L'évolution de l'incidence en fonction de l'âge dépend simultanément de l'effet de la cohorte de naissance, lié aux évolutions du mode de vie des femmes, et de l'effet de la période, lié notamment aux modifications des modalités de découverte des cancers. Un effet cohorte est mis en évidence systématiquement mais à des périodes différentes selon les pays (Estève, 2007). Après une hausse importante, une diminution du risque de développer un cancer du sein s'est manifestée dans certains pays (État-Unis, Canada, Écosse) pour les femmes nées après 1945 (Tarone, 2006). Les effets périodes se présentent sous différentes formes : des ruptures de tendance ont été observées, notamment aux États-Unis avec une hausse importante de l'incidence chez les femmes de plus de 45 ans entre 1980 et 2000 en relation avec des changements rapides de pratiques. Au contraire, d'autres pays comme la France connaissaient un effet période plus régulier sans doute lié au développement progressif des pratiques de dépistage individuel et organisé.

Il est donc difficile de distinguer les effets combinés des multiples facteurs susceptibles d'intervenir dans l'évolution de l'incidence du cancer du sein. Schématiquement, l'augmentation observée au cours des dernières décennies est en grande partie attribuée au développement du dépistage dans les pays industrialisés. Cependant, la part liée à l'augmentation des facteurs de risque est encore mal connue.

Évolution de l'incidence en France

L'incidence du cancer du sein est en hausse constante depuis 25 ans : le nombre de nouveaux cas a plus que doublé passant de 21 704 à 49 814 entre 1989 et 2005 et le taux d'incidence standardisé, éliminant l'effet de l'âge, a presque doublé sur cette période passant de 56,8 à 101,5 pour 100 000 femmes. D'après les dernières estimations (pour 2010), le taux d'incidence serait de 100,0 pour 100 000 (figure 5.4).

Il semble qu'une diminution de l'incidence du cancer du sein s'amorce après 2004, décrite en France à partir des données de mise en affection longue durée (Allemand et coll., 2008). La cause de cette évolution pourrait être une diminution massive de la prescription des traitements hormonaux substitutifs (THS) de la ménopause. Compte tenu de ces éléments, l'hypothèse retenue

pour réaliser les projections 2010 est un ralentissement de la croissance de l'incidence (figure 5.4, Hospice civils de Lyon et coll., 2010).

Un travail complémentaire de Francim (Colonna et coll., 2008) a permis de montrer que l'augmentation concerne toutes les tranches d'âge mais qu'elle est plus marquée chez les femmes de 50 à 75 ans. Cette tranche d'âge représente les femmes chez lesquelles le pic d'incidence des cancers du sein est observé mais également les femmes pour lesquelles un dépistage mammographique systématique est préconisé.

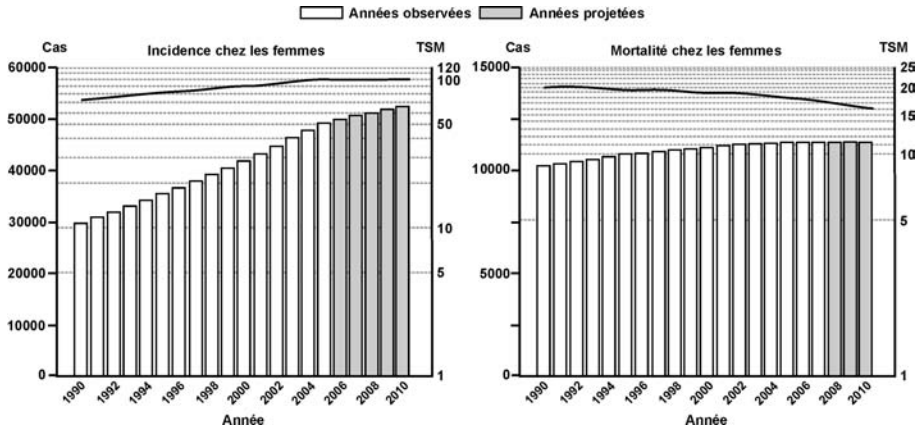


Figure 5.4 : Évolution de l'incidence (taux standardisés monde) et de la mortalité du cancer du sein chez la femme de 1990 à 2010 en France (d'après Hospices civils de Lyon et coll., 2010)

Les estimations pour 2010 sont des projections. Toute projection présente un certain niveau d'incertitude, notamment parce qu'elle oblige à faire certaines hypothèses sur ce qui s'est passé entre 2005 et 2010, période sur laquelle les données ne sont pas encore disponibles.

Le risque de développer un cancer du sein avant 75 ans a considérablement augmenté de 4,9 % pour les femmes nées en 1910 à 12,1 % pour les femmes nées en 1950. Cependant, après une augmentation particulièrement marquée de ce risque pour les femmes nées entre 1925 et 1945, on observe un infléchissement de l'augmentation pour la génération des femmes nées après 1945. Ce ralentissement observé chez les femmes des générations les plus récentes pourrait annoncer un infléchissement de l'augmentation de l'incidence, comme le laisse également présager le taux d'évolution plus faible entre 2000 et 2005.

Les mutations sur les gènes *BCRA1* et *BRCA2*, qui entraînent des risques extrêmement élevés de cancer du sein, sont rares et ne permettent d'expliquer qu'une faible proportion des cancers du sein d'origine familiale. Certains polymorphismes génétiques (appelés SNP pour *Single Nucleotide Polymorphism*) sont à l'inverse relativement fréquents dans la population (>1 %) et pourraient être associés à un risque accru de cancer. Toutefois, le risque de

cancer du sein associé à chacun de ces SNP, s'il existe, est faible, et leur rôle est difficile à mettre en évidence lorsqu'ils sont étudiés séparément.

Les principales causes environnementales suspectées dans le cancer du sein chez la femme incluent les composés chimiques ayant des effets œstrogéno-mimétiques connus sous le nom de perturbateurs endocriniens ou xéno-œstrogènes (pesticides organochlorés, PCB, dioxines...), différents composés chimiques reconnus comme des cancérogènes mammaires chez l'animal, ou certains agents physiques. Cependant, les données épidémiologiques actuelles sur les perturbateurs endocriniens d'origine environnementale sont insuffisantes pour permettre une conclusion (Inserm, 2008).

L'insuffisance des méthodes d'évaluation des expositions aux facteurs environnementaux constitue un problème majeur pour l'interprétation des résultats, notamment lorsque ceux-ci sont négatifs, car les erreurs de classement non différentiels (c'est-à-dire celles affectant de la même manière les cas et les témoins) sont vraisemblablement à l'origine d'un biais tendant généralement à ramener l'estimation du risque relatif vers l'unité (absence d'effet apparent). Les mesures d'exposition effectuées à des périodes non pertinentes sur le plan étiologique, constituent l'une des difficultés majeures pour la recherche des facteurs de risque des cancers du sein.

Cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est une tumeur maligne qui atteint un ou les deux ovaires. Les tumeurs ovariennes les plus fréquentes sont les tumeurs stromales-épithéliales. Elles proviennent de l'épithélium de surface de l'ovaire ou de ses dérivés. Il existe une forme intermédiaire entre tumeur bénigne et cancer nommée « *borderline* » représentant 10 à 15 % des tumeurs ovariennes, qui survient à un âge plus précoce que le cancer de l'ovaire. Elle est beaucoup moins agressive et son pronostic est bon, quoique incertain.

La complexité des tumeurs ovariennes tient à la multiplicité des types lésionnels rencontrés, conséquences d'une embryogenèse complexe. Les tumeurs épithéliales sont les plus fréquentes (2/3) des tumeurs ovariennes primitives. Macroscopiquement, il s'agit de tumeurs kystiques et papillaires, volontiers bilatérales. Outre les tumeurs épithéliales, on distingue les tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels et les tumeurs germinales. Les cancers de l'ovaire représentent environ 30 % des cancers du tractus génital féminin (Seidman et Kurman, 2003).

Incidence dans le monde

L'incidence des cancers de l'ovaire varie fortement avec un rapport de 1 à 6 selon les régions du monde. Les taux d'incidence standardisés les plus élevés, souvent supérieurs à 10 pour 100 000 femmes, sont observés en Amérique du Nord, en Europe et en Australie (Parkin et coll., 2002).

Incidence en France

Le réseau français des registres de cancers (Francim) estime à 4 411 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en 2005. Le taux d'incidence standardisé est de 8,2/100 000 personnes années (ce chiffre ne prend pas en compte les tumeurs *borderline)*.

Les estimations les plus récentes (figure 5.5, Hospice civils de Lyon et coll., 2010) sont des projections pour 2010, calculées à partir des données de 2005 et qui font l'hypothèse que la tendance récente de diminution se prolonge (les 5 dernières années). Le taux d'incidence en 2010 est estimé à 7,8 cas pour 100 000 personnes-années (4 532 nouveaux cas)[12] .

Le taux d'incidence augmente régulièrement jusqu'à 75 ans puis décroît lentement après 85 ans. On estime annuellement à 200 les cancers de l'ovaire qui seraient liés à une prédisposition génétique constitutionnelle en France.

Une augmentation d'incidence a été observée jusque dans les années 1980 pour la France. Depuis 1980, l'incidence de ce cancer est en baisse. Le taux d'incidence (standardisé monde) a diminué en moyenne de 0,4 % par an entre 1980 et 2005, avec une baisse plus marquée sur la dernière période (– 0,9 % par an entre 2000 et 2005) (figure 5.5).

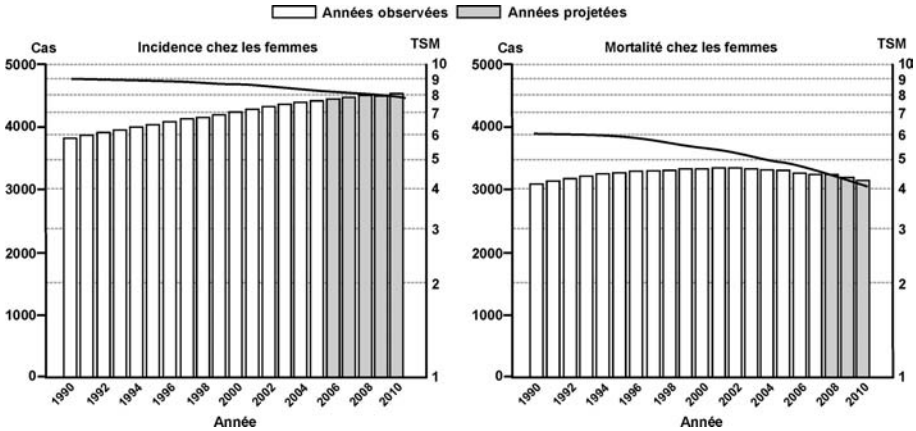


Figure 5.5 : Évolution de l'incidence (taux standardisés monde) et de la mortalité du cancer de l'ovaire de 1990 à 2010 en France (d'après Hospices civils de Lyon et coll., 2010)

Les estimations pour 2010 sont des projections. Toute projection présente un certain niveau d'incertitude, notamment parce qu'elle oblige à faire certaines hypothèses sur ce qui s'est passé entre 2005 et 2010, période sur laquelle les données ne sont pas encore disponibles.

Les facteurs de risque du cancer de l'ovaire sont assez mal connus. Les variations internationales des taux d'incidence de ce cancer indiquent que le mode

12. Estimation 2010 disponibles sur le site de l'InVS (http://www.invs.sante.fr/)

de vie, ou des facteurs environnementaux jouent un rôle dans l'étiologie de la maladie.

Le risque de cancer de l'ovaire serait plus élevé pour les femmes n'ayant pas eu d'enfant ou qui ont eu leur premier enfant à un âge tardif, pour les femmes ayant une puberté précoce ou une ménopause tardive. À l'inverse, les femmes qui ont utilisé des contraceptifs oraux et les multipares ont un risque réduit de cancer de l'ovaire (Chiaffarino et coll., 2001 ; Tung et coll., 2003 ; Whiteman et coll., 2003 ; Rossing et coll., 2004 ; La Vecchia, 2006 ; Soegaard et coll., 2007). La forte corpulence augmenterait le risque (Schouten et coll., 2003 ; Rossing et coll., 2006) et l'activité physique le diminuerait (Hannan, 2004) de même que la consommation de fruits ou de légumes, mais dans ces différentes études, l'effet sur le risque reste à confirmer (Koushik et coll., 2005).

En dépit d'une abondante littérature, les facteurs de risque professionnels et environnementaux du cancer de l'ovaire ne sont pas clairement établis en raison de l'existence de biais et du manque presque complet de données quantitatives de type exposition-réponse (Inserm, 2008).

La littérature épidémiologique publiée à partir de 1970 fait état de la relation entre risque de cancer de l'ovaire et de nombreuses professions (infirmières, professeurs, employées de nettoyage à sec, femmes du monde agricole, femmes dans l'industrie pharmaceutique, pharmaciennes, serveuses cuisinières...). Les études montrent très peu d'évidence d'excès de risque. Les coiffeuses, esthéticiennes, et les femmes employées dans l'imprimerie, peuvent présenter un excès de risque mais les données sont encore insuffisantes pour conclure de façon ferme. Peu d'agents chimiques ont été étudiés de manière approfondie (Inserm, 2008).

Bibliographie

ALLEMAND H, SERADOUR B, WEILL A, RICORDEAU P. Decline in breast cancer incidence in 2005 and 2006 in France: a paradoxical trend. *Bull Cancer* 2008, **95** : 11-15

ALTHUIS MD, DOZIER JM, ANDERSONWF, DEVESA SS, BRINTON LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiology* 2005, **34** : 405-412

BELOT A, GROSCLAUDE P, BOSSARD N, JOUGLA E, BENHAMOU E, et coll. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008, **5** : 159-175

BERGSTRÖM R, ADAMI HO, MÖHNER M, ZATONSKI W, STORM H, et coll. Increase in testicular cancer incidence in six european coutries : a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 1996, **88** : 727-733

BOTHA JL, BRAY F, SANKILA R, PARKIN DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003, **39** : 1718-1729

BRAY F, MCCARRON P, PARKIN DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 2004, **6** : 229-239

BRAY F, RICHIARDI L, EKBOM A, PUKKALA E, CUNINKOVA M, MØLLER H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries : continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int J Cancer* 2006, **118** : 3099-3111

CHIAFFARINO F, PELUCCHI C, PARAZZINI F, NEGRI E, FRANCESCHI S, et coll. Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. *Ann Oncol* 2001, **12** : 337-341

COLONNA M, DELAFOSSE P, UHRY Z, PONCET F, ARVEUX P, et coll. Is breast cancer incidence increasing among young women? An analysis of the trend in France for the period 1983-2002. *Breast* 2008, **17** : 289-292

COOK MB, AKRE O, FORMAN D, MADIGAN MP, RICHIARDI L, MCGLYNN KA. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer--experiences of the son. *Int J Epidemiol* 2010, **39** : 1605-1618

CURADO MP, EDWARDS B, SHIN HR, STORM H, FERLAY J, et coll. Cancer incidence in five continents, vol. IX Iarc scientific publications no. 160, Lyon, IARC, 2007

ESTÈVE J. Incidence du cancer du sein en France et dans les pays développés. *Presse Med* 2007, **36** : 315-321

HANNAN LM, LEITZMANN MF, LACEY JVJR, COLBERT LH, ALBANES D, et coll. Physical activity and risk of ovarian cancer: a prospective cohort study in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, **13** : 765-770

HARDELL L, VAN BAVEL B, LINDSTROM G, CARLBERG M, DREIFALDT AC, WIJKSTRÖM H, et coll. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 930-934

HEDELIN G, REMONTET L. Évolution du cancer du testicule en France. *Andrologie* 2002, **12** : 264-273

HENDERSONBE, PIKE MC, BERNSTEIN L, ROSS RK. Breast Cancer. *In:* Cancer Epidemiology and Prevention. SCHOTTENFELD D, FRAUMENI JF (eds). Oxford University Press, New York, 1996

HOSPICES CIVILS DE LYON, INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE, INSTITUT NATIONAL DU CANCER, FRANCIM, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010. Rapport technique. Avril 2010. (http: //www.invs.sante.fr/surveillance/cancers)

HUYGHE E, PLANTE P, THONNEAU PF. Testicular cancer variations in time and space in Europe. *Eur Urol* 2007, **51** : 621-628

INSERM. Cancer et environnement. Collection Expertise collective, Éditions Inserm, Paris, 2008

JEMAL A, WARD E, THUN MJ. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among US women. *Breast Cancer Res* 2007, **9** : R28

KOUSHIK A, HUNTER DJ, SPIEGELMAN D, ANDERSON KE, ARSLAN AA, et coll. Fruits and vegetables and ovarian cancer risk in a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14** : 2160-2167

LA VECCHIA C. Oral contraceptives and ovarian cancer: an update, 1998-2004. *Eur J Cancer Prev* 2006, **15** : 117-124

MALLICK S, BLANCHET P, MULTIGNER L. Prostate cancer incidence in Guadeloupe, a French Caribbean archipelago. *Eur Urol* 2005, **47** : 769-772

MCGLYNN KA. Environmental and host factors in testicular germ cell tumors. *Cancer Invest* 2001, **19** : 842-853

MC GLYNN KA, DEVESA SS, SIGURDSON AJ, BROWN LM, TSAO L, TARONE RE. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* 2003, **97** : 63-70

MEYER F, MOOREL, BAIRATI I, FRADETY. Downward trend in prostate cancer mortality in Quebec and Canada. *J Urol* 1999, **161** : 1189-1191

MIEUSSET R. Cryptorchidie et cancer du testicule *Andrologie* 1994, **4** : 190-196

MINAMI Y, TSUBONO Y, NISHINO Y, OHUCHI N, SHIBUYA D, HISAMICHI S. The increase of female breast cancer incidence in Japan: emergence of birth cohort effect. *Int J Cancer* 2004, **108** : 901-906

MØLLER H. Clue to the aetiology of testicular germ cell tumors from descriptive epidemiology. *Eur Urol* 1993, **23** : 8-15

MOSTOFI FK, SESTERHENN IA, DAVIS CJJ. A pathologist's view of prostatic carcinoma. *Cancer* 1993, **71** : 906-932

MULTIGNER L, NDONG JR, GIUSTI A, ROMANA M, DELACROIX-MAILLARD H, et coll. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010, **28** : 3457-3462

PARKIN DM, BRAY FI, DEVESA SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001,**37** : S4-S66

PARKIN DM, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, INTERNATIONAL ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES. Cancer incidence in Five Continents. Vol VIII. IARC Sc. Publ. N° 155, Lyon, France2002

POST P, DAMHUIS R, VAN DER MEYDEN A. Variation in survival of patients with prostate cancer in Europe since 1978. EUROCARE Working Group. *Eur J Cancer* 1998, **34** : 2226-2231

PURDUE MP, DEVESA SS, SIGURDSON AJ, MCGLYNN KA. International patterns and trends in testis cancer incidence. *Int J Cancer* 2005, **115** : 822-827

RAVDIN P, KATHLEEN A, CRONIN K, HOWLADER N, BERG CD, et coll. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007, **356** : 1670-1674

REMONTET L, BUEMI A, VELTEN M, JOUGLA E, ESTÈVE J. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, 2003a (http: //www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport cancer 2003)

REMONTET L, ESTEVE J, BOUVIER AM, GROSCLAUDE P, LAUNOY G, et coll. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publ* 2003b, **51** : 3-30

RIES LAG, MELBERT D, KRAPCHO M, MARIOTTO A, MILLER BA, et coll. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, (http:

//seer.cancer.gov/csr/1975_2004/) based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2007

ROSSING MA, TANG MT, FLAGG EW, WEISS LK, WICKLUND KG. A case-control study of ovarian cancer in relation to infertility and the use of ovulation-inducing drugs. *Am J Epidemiol* 2004, **160** : 1070-1078

ROSSING MA, TANG MT, FLAGG EW, WEISS LK, WICKLUND KG, WEISS NS. Body size and risk of epithelial ovarian cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2006, **17** : 713-720

SCHOUTEN LJ, GOLDBOHM RA, VAN DEN BRANDT PA. Height, weight, weight change, and ovarian cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Am J Epidemiol* 2003, **157** : 424

SEIDMAN JD, KURMAN RJ. Pathology of ovarian carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003, **17** : 909-925, vii

SLAMA R, BOUYER J, REMONTET L, SPIRA A. Epidemiology of Male Reproductive Function: a Field Searching for Tools. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2004, **52** : 221-242

SOEGAARD M, JENSEN A, HOGDALL E, CHRISTENSEN L, HOGDALL C, et coll. Different risk factor profiles for mucinous and nonmucinous ovarian cancer: results from the Danish MALOVA study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16** : 1160-1166

TARONE RE. Breast cancer trends among young women in the United States. *Epidemiology* 2006, **17** : 588-590

TUNG KH, GOODMAN MT, WU AH, MCDUFFIE K, WILKENS LR, et coll. Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type: a multiethnic case-control study. *Am J Epidemiol* 2003, **158** : 629-638

WALSCHAERTS M, HUYGHE E, MULLER A, BACHAUD JM, BUJAN L, THONNEAU P. Doubling of testicular cancer incidence over the last 20 years in southern France. *CACO* 2008, **19** : 155-161

WHITEMAN DC, SISKIND V, PURDIE DM, GREEN AC. Timing of pregnancy and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12** : 42-46

ZHENG T, HOLFORD TR, MA Z, WARD BA, FLANNERY J, BOYLE P. Continuing increase in incidence of germ-cell testis cancer in young adults : experience from Connecticut, USA 1935-1992. *Cancer* 1996, **65** : 723-729

6
Conclusions et perspectives de recherche

Un certain nombre d'études indiquent une augmentation de la prévalence des altérations de la fonction de reproduction de l'homme adulte au cours des dernières décennies dans de nombreux pays occidentaux. Les données les mieux documentées concernent le cancer du testicule dont l'augmentation de l'incidence en France et dans de nombreux pays européens est avérée ; son rythme de croissance suggère que des facteurs environnementaux et/ou des changements de mode de vie pourraient être impliqués. Parallèlement, il semble que la production et la qualité des spermatozoïdes aient diminué dans plusieurs pays. Par ailleurs, il existe des données récentes sur la prévalence des malformations génitales masculines hypospadias et cryptorchidies suggérant qu'elles seraient en augmentation. Si la détérioration temporelle de certaines caractéristiques spermatiques dans plusieurs régions des pays industrialisés semble plausible, aucune conclusion forte concernant l'évolution temporelle de la fertilité des couples au cours des dernières décennies dans les pays industrialisés ne peut être apportée. La mise en place d'un système de surveillance standardisé de la fertilité est souhaitable dans ces pays afin d'apporter une réponse claire à cette question.

Au début des années 2000, l'équipe du professeur Skakkebaek à Copenhague a formulé l'hypothèse d'une origine commune aux différentes anomalies lors du développement du testicule durant la gestation. Selon le concept de syndrome de dysgénésie testiculaire, la survenue d'un cancer du testicule, une altération de la production et de la qualité spermatique, la cryptorchidie et l'hypospadias auraient une origine et des causes communes conduisant à des perturbations périnatales de la différenciation des organes génitaux. Ce concept reste cependant controversé. Quoi qu'il en soit, l'augmentation rapide de la fréquence de ces anomalies, au moins dans certains lieux, suggère que des facteurs de style de vie et/ou l'exposition aux composés chimiques de l'environnement ayant une activité de perturbation endocrinienne seraient impliqués dans l'augmentation de la prévalence de ces pathologies.

Chez les filles dans les pays occidentaux, l'observation la plus marquante concerne la tendance séculaire à une puberté plus précoce. Là encore, l'évolution des conditions de vie (style de vie, obésité) est évoquée pour expliquer cette précocité.

En raison de l'impact potentiellement majeur de ces questions en termes de santé publique, il importe d'intensifier l'effort de recherche principalement dans le but de pouvoir documenter les tendances temporelles existantes ou supposées et d'apporter les preuves de l'impact reproductif ou non des expositions chimiques et/ou des facteurs comportementaux. Les altérations de la physiologie de la spermatogenèse décrites dans certaines régions seraient peut-être des indicateurs d'une exposition environnementale pouvant entraîner d'autres pathologies.

II

Fonction de reproduction et différences entre espèces

Introduction

Au début du développement, les gonades et les ébauches des organes génitaux sont indifférenciées tandis que les voies génitales sont bisexuées. Le gène *SRY* (*sex determining region of Y gene*), localisé sur le chromosome Y, contrôle le signal qui détermine la formation du testicule et le blocage du développement embryonnaire en ovaire. Le double système de voies génitales internes se différencie chez le mâle, à partir des canaux de Wolff, en épididyme, canal déférent et vésicules séminales et chez la femelle, à partir des canaux de Müller, en utérus. Cette différenciation chez le mâle (présence du gène *SRY*) dépend de l'activité hormonale du testicule fœtal qui sécrète deux hormones : l'hormone anti-müllérienne (AMH) par les cellules de Sertoli responsable de la régression des canaux de Müller et la testostérone par les cellules de Leydig responsable du maintien des canaux de Wollf. La testostérone et ses dérivés favorisent également le développement des organes génitaux externes (urètre, prostate, pénis, bourses). Peu de temps avant la naissance, les testicules, situés dans l'abdomen, descendent dans le scrotum. Cette migration est également sous le contrôle de la testostérone et d'une autre hormone sécrétée par les cellules de Leydig, l'*insuline-like factor* 3 (INSL3).

L'appareil génital est achevé à la fin du premier trimestre de grossesse. La poursuite de la maturation ne s'effectue que lentement pour s'achever au moment de la puberté. Les cellules germinales souches du testicule immature (gonocytes) restent inactives jusqu'à la puberté puis se transforment en spermatogonies souches. Par des divisions et des différenciations successives ce réservoir de cellules souches donne naissance aux spermatozoïdes. La spermatogenèse se poursuit tout au long de la vie. Il s'agit d'un processus lent et continu qui dure environ 70 jours. La production de spermatozoïdes est extrêmement variable d'un homme à l'autre (de quelques dizaines à quelques centaines de millions dans l'éjaculat).

Comme toutes les glandes endocrines, le testicule est sous le contrôle du complexe hypothalamo-hypophysaire. La gonadotrophine (GnRH) libérée par l'hypothalamus stimule la sécrétion de deux hormones hypophysaires : la folliculostimuline (FSH) et l'hormone luthéinisante (LH). La FSH agissant sur les cellules de Sertoli participe à l'initiation de la spermatogenèse. À la puberté, la LH augmente la production de testostérone qui agit directement sur les cellules de Sertoli pour assurer le bon déroulement de la spermatogenèse.

Dans l'embryon féminin (en l'absence de *SRY*) et grâce à l'expression d'autres gènes, la gonade indifférenciée se transforme en ovaire. En l'absence de testostérone et d'AMH, les canaux de Wollf régressent tandis que les canaux

de Müller se différencient en trompes de Fallope, utérus, et partie supérieure du vagin. Se développent également les organes génitaux externes.

Chez la fille, toutes les cellules germinales souches, les ovogonies, cessent de se diviser avant la naissance, après leur transformation en ovocytes à la première division méiotique. La plupart des ovocytes bloqués en phase de méiose disparaissent après la naissance et après la puberté. Le stock de cellules germinales disponibles est donc limité contrairement à ce qui se passe chez le garçon chez lequel la prolifération mitotique des spermatogonies souches se poursuit toute la vie.

Chez la femme, les ovaires produisent des ovules et sécrètent deux hormones, l'œstradiol et la progestérone. À la puberté, les ovocytes localisés dans les follicules primordiaux entrent régulièrement en croissance selon un processus dénommé folliculogenèse qui conduit l'ovocyte vers l'ovulation. Sur les 300 000 follicules primordiaux présents dans l'ovaire au moment de la puberté, seuls 400 au maximum auront une évolution complète au cours de la vie reproductive de la femme. L'épuisement du stock d'ovocytes et leur vieillissement expliquent la baisse de la fertilité chez la femme avec l'âge.

Au cours de la folliculogenèse, les cellules de la granulosa (qui ont la même origine que les cellules de Sertoli) deviennent sensibles à la FSH et vont continuer à se multiplier et à se différencier (comme les cellules de Leydig chez le mâle). Les androgènes sécrétés diffusent dans les cellules de la granulosa et, sous l'influence de la FSH, sont transformés en œstradiol. La différenciation des cellules de la granulosa produit également le liquide folliculaire et le follicule devient le follicule à antrum. La sécrétion brutale de LH déclenche la maturation finale de l'ovocyte et l'ovulation.

7
Développement des organes sexuels

Les organes sexuels (ovaires, testicules, organes génitaux internes et externes, glandes mammaires) ainsi que le système endocrine qui les régulent se développent pendant la vie fœtale au cours de périodes de développement précises et spécifiques de chaque espèce. Le concept de programmation fœtale initiée par David Barker dans les années 1980, a mis en évidence que des perturbations survenues précocement au cours de la vie fœtale dans l'alimentation maternelle pouvaient être à l'origine de maladies survenant à l'âge adulte. Il est donc important de connaître et de prendre en compte la chronologie de ces événements de différenciation précoce pour estimer les impacts que pourront avoir les perturbateurs endocriniens sur ces organes et les fonctions qui en découlent. Les grandes étapes du développement de ces organes seront décrites dans ce chapitre.

Facteurs génétiques de la détermination et différenciation du sexe

Chez tous les vertébrés, le testicule et l'ovaire se développent à partir d'une ébauche embryonnaire qui est initialement bipotentielle. À différents moments de son développement, variables en fonction des espèces, ce *primordium* s'engage dans la différenciation mâle ou femelle en fonction de son patrimoine génétique (mammifères, oiseaux) ou de facteurs environnementaux comme la température ou le comportement (reptiles, poissons). On distingue donc deux types de détermination du sexe, la détermination du sexe génétique (*Genetic Sex Determination*-GSD) ou la détermination du sexe environnementale (*Environmental Sex Determination*-ESD).

Il sera important de prendre en compte ces différents modes de détermination sexuelle pour évaluer les effets de facteurs environnementaux comme les perturbateurs endocriniens sur cette détermination sexuelle. En effet, les espèces à ESD sont beaucoup plus sensibles à ces facteurs que les espèces à GSD. Une modification du milieu chez les poissons pourra donc avoir des conséquences plus importantes que chez d'autres espèces de vertébrés.

Chez les mammifères, le sexe est déterminé génétiquement à la fécondation selon que le spermatozoïde est porteur ou non du chromosome Y (XX pour la femelle et XY pour le mâle). Le gène *SRY* présent sur le chromosome Y induit la différenciation mâle des cellules somatiques en cellules de Sertoli suite à une cascade de gènes (Kashimada et Koopman, 2010). Chez la femelle, l'absence d'Y est nécessaire à la différenciation d'un ovaire. Cependant, la cascade génétique est moins bien connue chez la femelle. Cette étape précoce de différenciation des cellules somatiques de la gonade est cruciale pour le devenir du testicule ou de l'ovaire (figure 7.1).

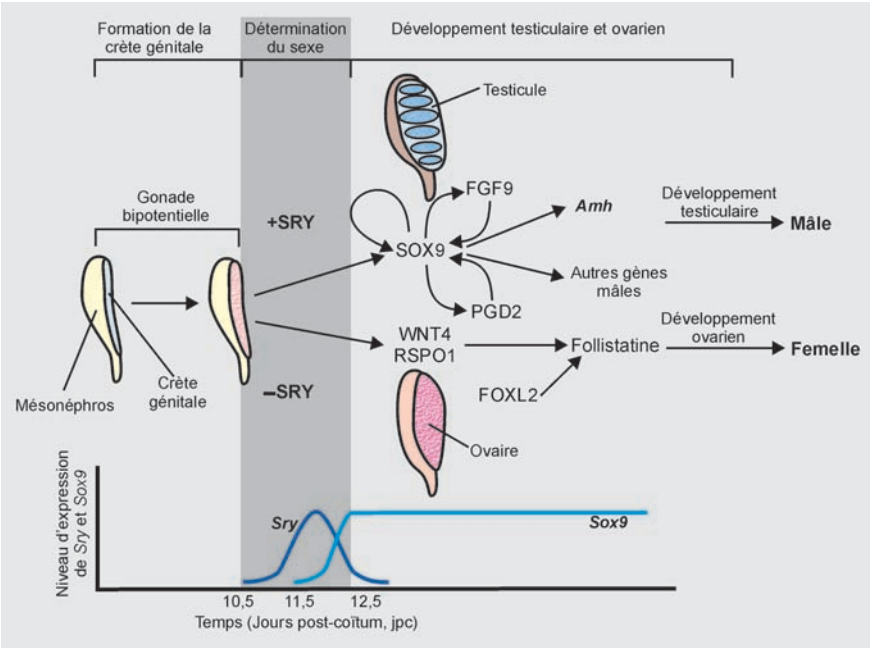


Figure 7.1 : Schéma récapitulatif de la détermination du sexe chez la souris (d'après Kashimada et Koopman, 2010)

L'expression du gène *SRY* démarre à 10,5 jours post coïtum (jpc) dans les cellules somatiques de la gonade mâle et atteint son maximum à 11,5 jpc puis s'éteint à 12,5 jpc. *SRY* active le gène *Sox9* qui induit la différenciation des cellules de Sertoli. Plusieurs boucles de régulation sont activées qui maintiennent l'expression de *Sox9* à un niveau élevé. *Sox9* active plusieurs gènes mâles spécifiques comme l'AMH (*Anti-Mullérienne Hormone*). Dans la gonade femelle, en absence du gène *SRY,* les gènes *Wnt4, Rspo1 et FoxL2* sont exprimés et induisent le développement ovarien.

Il a été montré par des expériences d'inactivation de gènes chez la souris que l'altération de l'expression de gènes actifs à cette période très précoce de la vie avait des répercussions sur la fonction de reproduction des animaux à l'âge adulte : infertilité ou inversion sexuelle (Chaboissier et coll., 2004 ; Parma et coll., 2006 ;

Pannetier et coll., 2010). Toute substance chimique capable de perturber ces étapes précoces aura des effets néfastes sur la fonction de reproduction.

En fonction du sexe génétique, l'appareil génital se différencie pour produire des gamètes (gamétogenèse des cellules germinales) et synthétiser des hormones (stéroïdogenèse) sous l'effet desquelles les tractus interne et externe vont évoluer pour permettre la reproduction de l'individu.

L'appareil génital comprend les gonades (ovaires ou testicules) qui engendrent les cellules germinales, les voies internes qui évacuent les produits génitaux (avec des glandes qui peuvent être annexées aux conduits vecteurs) et les organes génitaux externes qui servent à l'accouplement.

Différenciation des gonades

Chez les mammifères, les gonades se forment pendant la vie intra-utérine au cours du premier tiers de la gestation selon les espèces (9,5-10 jours post-conception chez la souris; 24 jours chez la brebis et 30 jours chez l'homme). Les gonades se différencient sur la face ventrale du mésonéphros et sont colonisées par les cellules germinales primordiales (*Primordial Germ Cell*-PGC) qui ont une origine extra-embryonnaire.

Les PGC, une fois arrivées dans les ébauches gonadiques (10,5-11,5 jpc chez la souris), vont proliférer intensivement. Elles se localisent différemment en fonction du sexe, en périphérie chez les femelles et dans toute la gonade chez le mâle.

Le testicule est organisé en cordons séminifères dans lesquels les cellules somatiques (cellules de Sertoli) entourent les cellules germinales (spermatogonies). Les cellules stéroïdogènes (cellules de Leydig), sources de testostérone, sont localisées à l'extérieur des tubes.

Les ovaires ont une structure caractéristique en cortex-médulla. Les ovogonies se développent dans le cortex, entourées de cellules de granulosa et des cellules steroïdogènes (figure 7.2).

Les gonades mâles et femelles n'ont pas la même dépendance vis-à-vis des cellules germinales. En effet, les cellules germinales mâles ne sont pas nécessaires à la différenciation et à la maintenance du testicule alors que les PGC femelles le sont pour l'ovaire. Chez la souris, la perte des cellules germinales dans l'ovaire périnatal cause la désorganisation de l'ovaire postnatal et l'interruption de la folliculogenèse (Guigon et coll., 2005 ; Mazaud Guittot et coll., 2006). Dans l'espèce humaine, les individus femelles XO (un seul chromosome X) qui ont perdu leur PGC avant l'âge adulte (syndrome de Turner) ont des bandelettes fibreuses à la place des ovaires. Il en est de même pour les jeunes femmes XX ayant perdu leurs cellules germinales précocement (chimiothérapie). Les cellules germinales femelles auraient également comme rôle d'empêcher la différenciation d'un testicule dans la gonade femelle. Le stade auquel les cellules germinales sont perdues peut

avoir un impact sur la sévérité du dysfonctionnement qui peut aller jusqu'à l'inversion sexuelle, comme cela est montré chez la souris (Guigon et Magre, 2006).

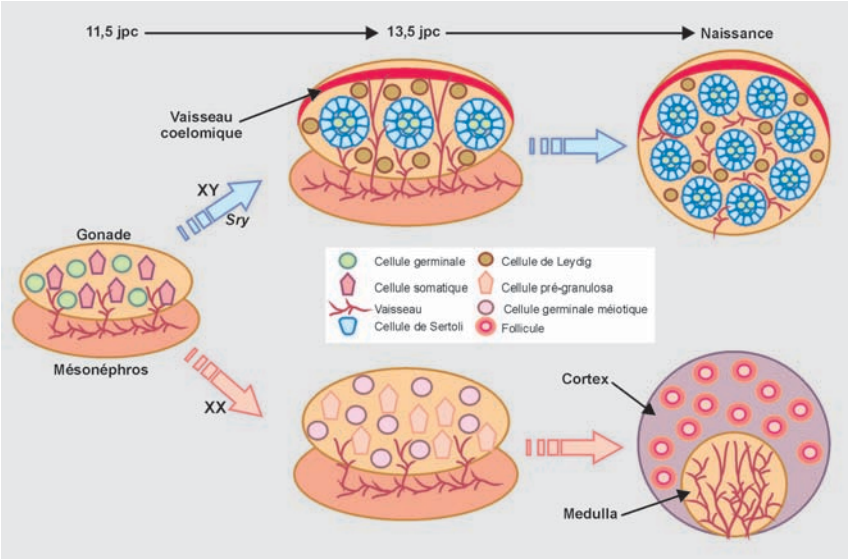


Figure 7.2 : Schéma récapitulatif de la différenciation des gonades chez la souris (d'après DeFalco et Capel, 2009)

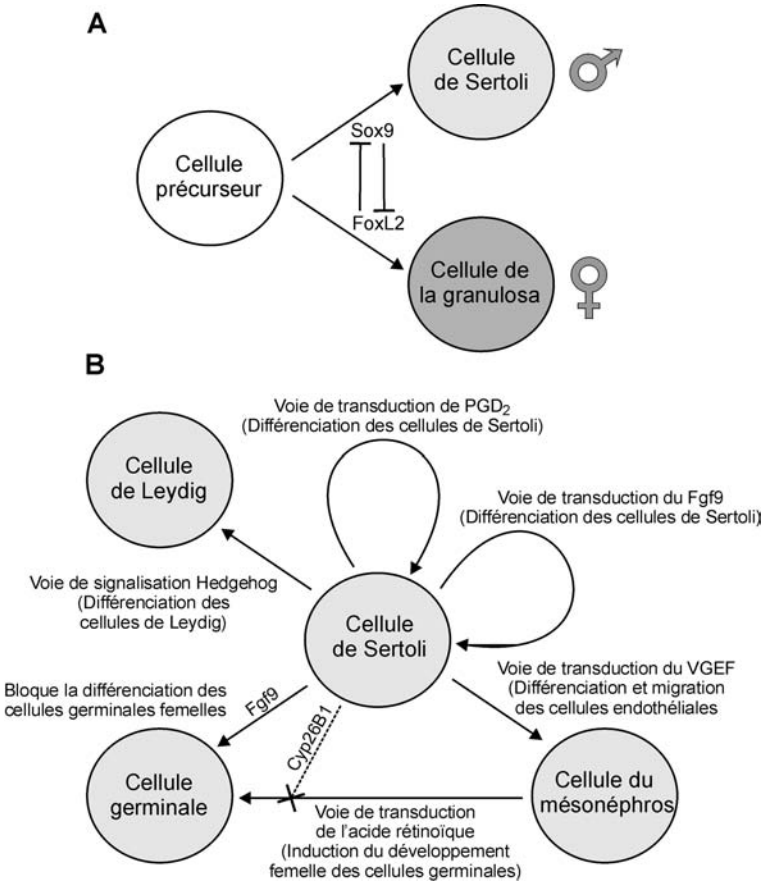
Dès 13,5 jours post coïtum (jpc), sous l'action du facteur *Sox9*, les cellules de Sertoli se différencient et s'organisent en tubes séminifères, englobant les cellules germinales. Une vascularisation de type mâle se met en place. Dans la gonade femelle, les cellules germinales se localisent dans le cortex, tandis que le réseau vasculaire se développe dans la medulla.

Une notion importante à garder en tête est la plasticité du système de détermination sexuelle, à tout moment de son développement. Le maintien dans un phénotype sexuel mâle ou femelle est basé sur un système de signalisation antagoniste (Sox9 pour le mâle et FoxL2 pour la femelle chez les mammifères) auquel sont associées de multiples boucles de régulation (figures 7.3A et B).

Tout déséquilibre du système à différents points d'entrée va être amplifié et propagé par les boucles de régulation et engendrer des altérations du développement testiculaire ou ovarien pouvant aller de la subfertilité jusqu'à l'inversion sexuelle. En fonction du nombre et du moment où les cellules germinales vont être perdues, on pourra obtenir tout un spectre de physiopathologies plus ou moins sévères.

Suite à ces premières étapes, s'en suit une période d'intense prolifération des cellules germinales. Selon les espèces, cette période est sous le contrôle des œstrogènes chez les femelles (ruminants). Le fait que la stéroïdogenèse soit active ou non chez les femelles pendant la vie fœtale constitue une différence

importante entre espèces. Les espèces avec un système hormonal actif seront plus sensibles aux effets de perturbateurs endocriniens que celles, comme les rongeurs, chez lesquelles le système est inactif pendant la vie fœtale. À l'inverse, chez les mâles, la stéroïdogenèse est activée précocement quelles que soient les espèces.



Figures 7.3A et 7.3B : Schéma récapitulatif du déterminisme génétique du sexe et de la différenciation gonadique chez la souris

Très tôt, les cellules somatiques de la gonade (cellules de soutien-Sertoli chez le mâle et granulosa chez la femelle) vont se déterminer dans un sexe sous l'action de deux facteurs de transcription antagonistes Sox9 et FoxL2. Une fois la détermination initiée, celle-ci est maintenue par une boucle de régulation et par des interactions cellulaires avec d'autres types cellulaires (ici exemple du testicule).

Un événement majeur va ensuite avoir lieu au niveau des cellules germinales. Tandis que les PGC mâles vont cesser de se multiplier et entrer en quiescence, les PGC femelles vont entrer en prophase I de méiose. L'entrée en méiose est contrôlée en partie par la voie de signalisation de l'acide rétinoïque, laquelle est

bloquée chez le mâle. La cascade moléculaire impliquée dans l'arrêt mitotique des spermatogonies n'est pas complètement connue mais plusieurs facteurs clés ont été découverts récemment (Bowles et Koopman, 2010 ; figure 7.4). Chez la femelle, le rôle de l'acide rétinoïque dans l'initiation et le déroulement de la méiose semble également différent en fonction des espèces (Le Bouffant et coll., 2010). Le stade de développement auquel la méiose va survenir varie selon les espèces, il conviendra d'en tenir compte pour évaluer l'impact des perturbateurs endocriniens sur la gamétogenèse en fonction des fenêtres d'exposition.

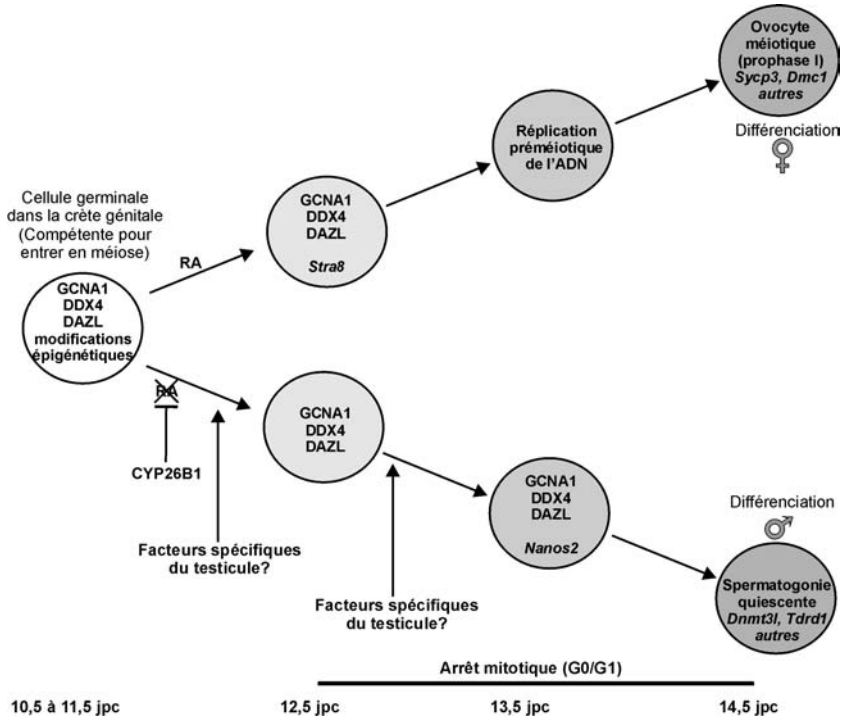


Figure 7.4 : Principaux facteurs impliqués dans la détermination sexuelle des cellules germinales fœtales chez la souris (d'après Bowles et Koopman, 2010)

Après être entrées dans les gonades, les cellules germinales primordiales (PGC) expriment les facteurs GCNA1, DDX4, et DAZL, et deviennent compétentes pour entrer en méiose. En présence d'acide rétinoïque (RA), produit par les cellules somatiques, les cellules germinales commencent à exprimer *Stra8* vers 12,5 jours post coïtum (jpc) et initient la réplication pré-méiotique de l'ADN. Les gènes de méiose sont *up* régulés, et les PGC entrent en prophase I de méiose, s'engageant ainsi dans la voie femelle. Si RA est dégradé par l'enzyme CYP26B1, les cellules germinales n'expriment pas *Stra8*. L'arrêt mitotique des PGC mâles a lieu dès 12,5 jpc. À 13,5 jpc, les PGC commencent à exprimer *Nanos2*. À 14,5 jpc, des spermatogonies quiescentes en arrêt mitotique G_0/G_1, sont observées. Ces spermatogonies expriment des gènes de la voie mâle comme *Dnmt3l* and *Tdrd1*.

Différenciation testiculaire

La différenciation testiculaire est caractérisée par la formation de cordons séminifères, c'est-à-dire de cordons épithéliaux composés de cellules germinales (les spermatogonies, qui subissent une période de multiplication puis un arrêt mitotique dû à l'environnement testiculaire) et de cellules somatiques (les cellules de Sertoli). La différenciation des cellules de Sertoli est le premier évènement de l'organogenèse testiculaire. En même temps se différencie la tunique albuginée, assise de tissu conjonctif se développant sous l'épithélium cœlomique. Entre ces cordons, au sein du mésenchyme, les cellules de Leydig se différencient, à partir de la huitième semaine chez l'homme.

Le testicule fœtal, très précocement, sécrète deux types d'hormones : l'hormone anti-müllérienne (AMH) sécrétée par les cellules de Sertoli et la testostérone produite par les cellules de Leydig. Ces hormones exercent deux sortes d'action pendant la différenciation de l'appareil génital, d'une part, l'AMH provoque la disparition des canaux de Müller, d'autre part, la testostérone ou la dihydrotestostérone (DHT) sont responsables de la différenciation des voies génitales mâles, la masculinisation du sinus urogénital et des organes génitaux externes (figure 7.5).

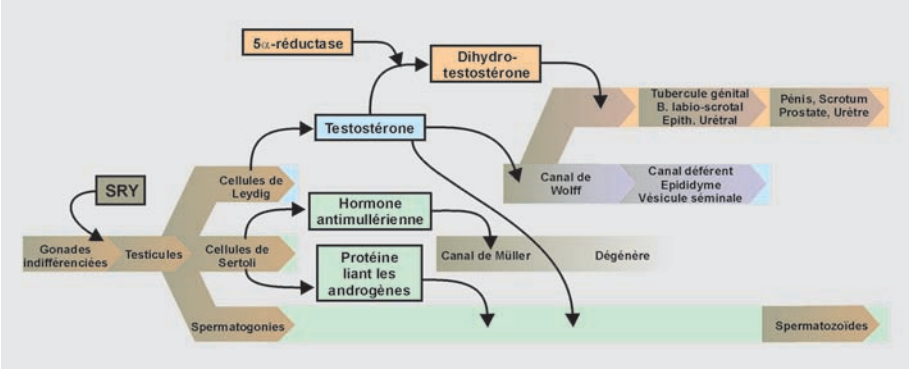


Figure 7.5 : Schéma représentant l'implication des hormones testiculaires dans la différenciation du tractus génital mâle

Les cellules de Leydig produisent également le facteur 3 insulino-semblable (INSL3). INSL3 est produit aussi bien dans les cellules de Leydig fœtales que dans ces mêmes cellules adultes. Il a été démontré que le principal facteur responsable du développement (épaississement et allongement) du gubernaculum, le ligament qui fixe le testicule au scrotum, au début de la différenciation sexuelle mâle, était INSL3. De plus, les souris mâles chez lesquelles le gène codant pour INSL3 a été invalidé, présentent toutes un phénotype cryptorchide évident, sans aucune autre anomalie génitale (Feng et coll., 2009).

Testicule durant l'enfance

À la naissance, les testicules contiennent des cellules de Leydig néonatales et des cordons séminifères (sans lumière centrale) dans lesquels vont être retrouvées les cellules de Sertoli immatures et les cellules germinales néonatales dont on pense qu'il existe trois types : les gonocytes, les cellules intermédiaires et les pré-spermatogonies (Mieusset, 2010).

La réactivation après la naissance du système hypothalamo-hypophyso-testiculaire appelé mini puberté entraîne une augmentation des sécrétions de gonadotrophines qui atteint un maximum vers 2-3 mois. La sécrétion de testostérone est le résultat de la stimulation et de la multiplication des cellules de Leydig, sécrétion qui va ensuite diminuer après le 3e mois. L'AMH augmente au premier mois pour atteindre un maximum vers 6 mois, puis décroît durant l'enfance. L'inhibine va également augmenter pour atteindre un pic avec des valeurs supérieures à celles retrouvées chez l'adulte, pour décroître après 15 mois et avoir des valeurs basses jusqu'à la puberté.

Après la naissance, les cellules germinales se transforment en spermatogonies Ad (voir plus loin), dont le nombre pourrait être un des facteurs conditionnant la spermatogenèse à l'âge adulte.

Des cellules germinales allant jusqu'au stade spermatocytes I ont pu être retrouvées chez le petit enfant témoignant d'une évolution occasionnelle des spermatogonies et montrant que le testicule de l'enfant n'était pas obligatoirement au repos (Chemes, 2001).

Les cellules de Sertoli immatures, n'exprimant pas le récepteur aux androgènes et exprimant l'AMH, vont se multiplier. À la puberté (environ 9-14 ans), les cellules de Sertoli deviennent matures et expriment le récepteur des androgènes et la sécrétion d'AMH diminue.

Dans le contexte d'exposition à des substances pouvant avoir un effet délétère sur la fonction de reproduction masculine, l'ensemble des processus physiologiques se déroulant durant l'enfance, et notamment en période postnatale, ne doit pas être ignoré, dans la mesure où ces étapes sont probablement importantes pour une spermatogenèse optimale chez l'adulte.

Développement de l'ovaire

Le développement de l'ovaire comporte deux étapes clés : la méiose des ovogonies et la formation des follicules, le follicule étant l'unité fonctionnelle de l'ovaire. Il existe un décalage dans le temps entre la différenciation mâle et femelle. Chez tous les mammifères, la différenciation ovarienne est plus tardive que la différenciation testiculaire (voir tableau 7.I). Il faudra en tenir compte dans le choix des fenêtres d'exposition.

Formation des follicules

On distingue deux grandes phases de formation des follicules, celle indépendante des hormones gonadotropes et celle qui survient après la puberté sous le contrôle hormonal. En dehors de l'ovocyte, le follicule est composé de cellules somatiques nourricières, les cellules de granulosa ou cellules folliculaires. Puis dans un deuxième temps, se différencient les cellules de la thèque qui fournissent aux cellules de granulosa productrices d'œstrogènes par l'enzyme aromatase, le précurseur androstènedione.

Les différents stades de la folliculogenèse sont la formation des follicules primordiaux (pool ou réserve ovarienne), le recrutement des follicules à partir du pool des primordiaux pour former les follicules primaires, secondaires, tertiaires et enfin les follicules ovulatoires et le corps jaune.

Formation des follicules primordiaux

Les ovocytes après avoir entamé leur prophase 1 de méiose vont interrompre celle-ci au stade diplotène et rester bloqués jusqu'à la reprise de méiose au moment de l'ovulation soit plus de 15 à 50 ans plus tard chez la femme. Chez la souris, la méiose est arrêtée à 14,5 jpc. Avant de former les follicules, les ovocytes bloqués sont regroupés en nids ovigères aussi appelés cystes. Les follicules primordiaux se forment de la rupture de ces nids et de l'association d'un ovocyte avec quelques (3-4) cellules pre-granulosa. Cette association représente le premier stade de la folliculogenèse ; il a lieu pendant la dernière moitié de la gestation chez l'homme et quelques jours après la naissance chez la souris (Baker, 1963 ; Hirshfield, 1991).

Chez les mammifères, la population de follicules primordiaux créée dans l'ovaire fœtal ou néonatal constitue un pool fini d'ovocytes appelé la réserve, disponible pendant toute la durée de vie reproductive des femelles. Cela constitue une différence majeure entre mâles et femelles. Car chez les mâles, la méiose n'aura lieu qu'après la puberté, sans interruption et le renouvellement des spermatogonies aura lieu durant toute la vie adulte.

Une exposition *in utero* pourra donc avoir des effets à très long terme sur la fertilité femelle, une altération de la réserve est irréversible alors que chez le mâle la spermatogenèse est continue.

Maintenance des follicules primordiaux et recrutement initial

Le recrutement des follicules est généralement subdivisé en deux catégories : tout d'abord l'activation initiale des follicules primordiaux, qui se produit toute la vie jusqu'à la ménopause chez la femme, et ensuite, après la puberté, le recrutement cyclique d'un nombre limité de petits follicules à partir des follicules en croissance, à partir desquels une sous-fraction ou un seul sera sélectionné pour la dominance et l'ovulation (McGee et Hsueh, 2000). Bien que le recrutement initial des primordiaux vers le pool en croissance reste un

processus peu compris, l'étude de souris mutantes (*knock out*) a permis l'identification de plusieurs facteurs clés régulateurs de cette étape précoce de la folliculogenèse parmi lesquels des facteurs de transcription (Nobox, FoxL2...) et des facteurs de croissance (BMP15, GDF9) (Edson et coll., 2009).

Tableau 7.I : Chronologie de la différenciation des gonades

Principales étapes chez les mâles (M) et les femelles (F)	Stade de développement chez la souris (et le rat) en jours post coïtum (jpc)	Stade de développement chez l'homme en semaines post conception (sem)
Migration des cellules génitales dans la crête génitale	10 à 11 jpc (13 jpc)	4 à 5 sem
Différenciation des cordons séminifères (M)	12 jpc (14 jpc)	7 sem
Différenciation des cellules de Leydig (M)	12,5-13 jpc (15 jpc)	8 sem
Début de la prophase méiotique (F)	13,5 à 14 jpc (16,5-17 jpc)	9-11 sem
Début de la folliculogénèse (F)	À la naissance (3 jours après la naissance)	15-16 sem

Cependant, il est important de noter que bien que les gonades adultes présentent des structures remarquablement similaires d'un point de vue morphologique chez différentes espèces de vertébrés, les mécanismes moléculaires et cellulaires utilisés pour créer ces organes similaires ne sont pas conservés au cours de l'évolution. Il faudra donc en tenir compte avant d'extrapoler d'une espèce à l'autre.

Formation du tractus génital interne et externe

Voies génitales internes

Au moment où débute la différenciation gonadique mâle, le tractus est encore sexuellement indifférencié. Le mésonéphros s'est mis en place, pendant la quatrième semaine du développement fœtal humain. Dans le mésonéphros, des néphrons débouchent dans le canal de Wolff, qui, à la cinquième semaine, continue son extension sous la vessie jusqu'au sinus-urogénital, et forme un diverticule à la hauteur de l'ébauche du métanéphros (futur rein). Quant au canal de Müller, il est issu d'une invagination de l'épithélium cœlomique de la région antérieure du mésonéphros, ayant pris naissance à proximité de la région antérieure du canal de Wolff au cours de la sixième semaine, pendant la période de formation des crêtes génitales. Il se développe ensuite vers l'avant et vers l'arrière jusqu'au sinus urogénital en cheminant le long du canal de Wolff.

Chez le fœtus mâle, la différenciation des voies génitales, en réponse à l'action de la testostérone produite par les cellules de Leydig dans les testicules fœtaux, débute dès la 8e semaine de gestation dans l'espèce humaine.

Deux phénomènes vont marquer la différenciation des voies génitales masculines :
- la régression des canaux paramésonéphrotiques (de Müller) ;
- le développement et la différenciation des canaux mésonéphrotiques (de Wolff).

Sous l'action de l'AMH, les canaux de Müller régressent totalement, ne laissant qu'un reliquat facultatif au niveau de l'épididyme (l'hydatide sessile) et un petit diverticule de l'urètre prostatique (l'utricule prostatique).

Dans leur partie moyenne, les canaux de Wolff, sous l'action des androgènes, constituent les canaux épididymaires, où s'abouchent les canaux efférents. Dans leur portion inférieure, ils deviennent les canaux éjaculateurs qui débouchent dans l'urètre prostatique. En résumé, le canal mésonéphrotique (canal de Wolff) va donner naissance à l'épididyme, au canal déférent, à la vésicule séminale et au canal éjaculateur.

Différenciation des glandes sexuelles accessoires

Les vésicules séminales vont se différencier au cours de la 12e semaine, à partir d'une évagination du canal déférent. Ces glandes paires produisent l'essentiel des sécrétions nourricières pour le sperme. La partie du canal de Wolff comprise entre les vésicules séminales et l'urètre prostatique s'appelle le canal éjaculateur. Entre les deux canaux éjaculateurs s'abouche l'utricule prostatique impair (vestige des canaux de Müller).

La prostate se développe à partir d'excroissances entoblastiques de la face postérieure de l'urètre prostatique dans le courant de la 12e semaine. La glande devient active à partir de la 15e semaine. Elle englobe à ce stade les canaux éjaculateurs et l'utricule prostatique ainsi que l'urètre prostatique.

Dans le courant de la 12e semaine et parallèlement au développement de la prostate, les glandes bulbo-urétrales (de Cowper) se développent à partir de bourgeonnements entoblastiques pairs de l'urètre pénien qui fait suite à l'urètre prostatique. Ce sont finalement les sécrétions des vésicules séminales, de la prostate et des glandes bulbo-urétrales et urétrales qui entrent dans la composition du liquide séminal.

Les organes génitaux externes se forment de la 9e à la 14e semaine de gestation chez l'homme, à partir du tubercule génital. Les orifices génital et urinaire sont communs.

Enfin, la migration des testicules en dehors de l'abdomen, dans le scrotum, se fait durant le septième et le huitième mois de la grossesse. La position des testicules est déterminée par deux ligaments génitaux : le ligament suspenseur crânial et le gubernaculum (ou ligament génital caudal). Chez les mâles, c'est la croissance des gubernaculums qui permet la descente des testicules en position scrotale. L'absence de cette descente testiculaire, ou cryptorchidie, entraîne une stérilité.

Chez le fœtus femelle, c'est durant la 7e semaine de gestation que les voies génitales se différencient. En l'absence d'AMH, les canaux mésonéphrotiques (de Wolff) régressent et les conduits paramésonéphrotiques ou canaux de Müller donnent naissance aux futures trompes utérines, à l'utérus et à la partie supérieure du vagin.

Les canaux de Wolff régressent à l'exception de quelques vestiges embryonnaires : l'époophore, le paroophore au niveau du mésovarium et de petits kystes allongés appelés canaux de Gartner au niveau du vagin.

Les canaux de Müller forment, dans leurs segments supérieurs, les trompes de Fallope. Dans leurs segments inférieurs, ils fusionnent pour constituer le canal utéro-vaginal (présentant un renflement postérieur, le tubercule de Müller) alors que les segments moyens évoluent en deux cornes utérines. À partir du quatrième mois, les deux cornes utérines se soudent en un utérus unique, le tubercule de Müller devient le col de l'utérus et le vagin se cavite. La partie distale des conduits, génital (partie basse du vagin) et urinaire, dépend de l'évolution du sinus urogénital, à partir du quatrième mois. Les organes génitaux externes se forment au cours du troisième mois à partir du tubercule génital. Les orifices urinaire et génital sont totalement distincts l'un de l'autre.

Organes génitaux externes

Il est important de remarquer que l'aspect morphologique des organes génitaux externes est similaire dans les deux sexes jusqu'à la 9e semaine.

Chez le mâle, sous l'effet des hormones androgènes, la différenciation et le développement des organes génitaux, deviennent manifestes à partir du 3e mois chez le fœtus humain masculin (tableau 7.II).

Le tubercule génital s'allonge pour former le pénis et entraîne avec lui les replis urogénitaux. La partie postérieure des bourrelets labio-scrotaux se transforme en bourrelets scrotaux. L'urètre pénien s'entoure d'une masse de tissu mésenchymateux érectile, le corps spongieux, qui se prolonge dans l'extrémité du pénis, formant le gland. Au-dessus du corps spongieux, les deux corps caverneux complètent le tissu érectile du pénis. Les deux bourrelets scrotaux fusionnent à leur tour sur la ligne médiane et forment le scrotum. La ligne de soudure du scrotum et du pénis est appelée le raphé médian.

Les mécanismes du développement des organes génitaux externes chez la femelle restent encore largement incompris, mais les œstrogènes sécrétés par le placenta et les ovaires fœtaux semblent y contribuer.

Le tubercule génital ne s'allonge que très peu, puis régresse dès la 14e semaine et devient le clitoris. Les plis urogénitaux ne fusionnent pas à ce niveau et le sinus urogénital reste largement ouvert avec l'urètre à sa partie antérieure et le vagin à sa partie postérieure (portion vestibulaire du sinus). Les plis urogénitaux non fusionnés donneront naissance aux petites lèvres (labia minora),

alors que les plis labioscrotaux vont former les grandes lèvres (labia majora), qui fusionnent à l'arrière pour former la commissure labiale postérieure, alors qu'antérieurement elles forment le mont pubis.

Tableau 7.II : Chronologie de la différenciation du tractus génital

Principales étapes Fœtus mâles (M) et femelles (F)	Âge du fœtus murin en jours post coïtum (jpc)	Âge du fœtus humain en semaine post conception (sem)
Régression des canaux de Müller	14 jpc	8 sem
Masculinisation des organes génitaux externes, distance anogénitale augmentée (M)	16 jpc	9 à 10 sem
Vésicules séminales (M)	16 jpc	10 sem
Bourgeons prostatiques (M)	17 jpc	10 sem
Régression des canaux de Wolff (F)	15 jpc	10 sem
Fin de la migration testiculaire (M)	18 jpc	
intra-abdominale		12 sem
intra-scrotale		28 sem

La différenciation des organes génitaux externes aboutit à une différence de longueur de la distance anogénitale entre les sexes. Celle-ci est courte chez la femelle et plus longue chez le mâle (figure 7.6).

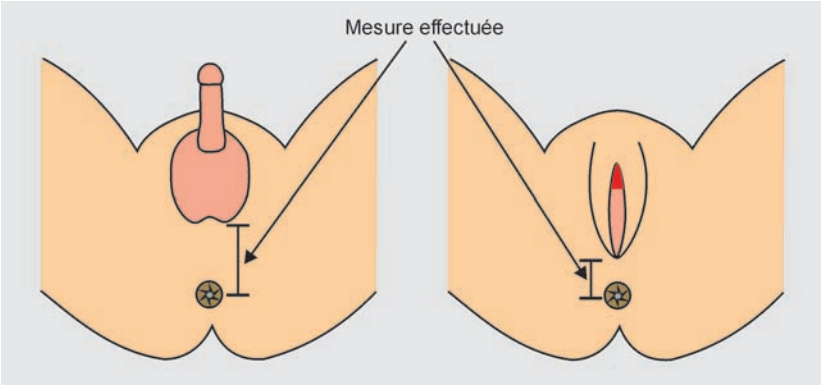


Figure 7.6 : Mesure de la distance anogénitale chez le nouveau-né humain (d'après Salazar-Martinez et coll., 2004)

La distance anogénitale est une mesure utilisée pour traduire le taux d'hormones auquel l'individu a été exposé *in utero* ou dans la prime enfance. D'abord développée et utilisée par les biologistes sur des modèles animaux, elle est également utilisée chez l'homme dans le cadre d'études sur les perturbateurs endocriniens. Cette distance augmente chez le garçon lorsque, *in utero*, le

testicule embryonnaire commence à produire de la testostérone. Du développement fœtal à la puberté, cette distance est contrôlée par les hormones. Il a été montré qu'une distance anogénitale plus petite était un signe de féminisation des rongeurs mâles, un indicateur qui traduit en fait une moindre exposition fœtale des cellules à la testostérone et qui s'accompagne souvent d'anomalies du développement des organes génitaux mâles (micropénis en particulier). Chez l'homme, la distance anogénitale semble également corrélable avec un risque augmenté d'anomalies qui évoquent une féminisation (que l'on suppose due à l'exposition à des perturbateurs endocriniens lors de la vie fœtale, au moment de la formation des testicules).

Développement mammaire

Période embryonnaire

Au cours de la 5e semaine de gestation, l'ectoblaste s'épaissit de chaque côté du tronc entre les racines des membres supérieur et inférieur pour former les bandes mammaires. Ceci se produit par migration et concentration cellulaires et non par multiplication des cellules (Balinsky, 1950 chez le lapin). Les bandes mammaires s'épaississent grâce à la participation du mésenchyme sous-jacent, on parle alors de crêtes mammaires. Rapidement, les crêtes régressent, laissant 5 à 7 points mammaires de chaque côté. La plupart des points mammaires régressent également. À la 8e semaine chez l'homme, un seul point mammaire persiste de chaque côté, en région thoracique.

Au niveau de ce point mammaire, un nodule ectoblastique plein s'enfonce dans une condensation du mésenchyme sous-jacent pour former le bourgeon mammaire primaire dont l'évolution s'arrête temporairement.

Période fœtale

La croissance reprend vers le 5e mois. Le bourgeon primaire se déprime en surface (cupule mammaire) et émet en profondeur 15 à 20 bourgeons secondaires pleins. Les extrémités vont se diviser. Puis, à mi-longueur de ces cordons pleins, une lumière apparaît par destruction des cellules internes. Au cours des 8e et 9e mois, les ramifications s'étendent et les cellules externes se différencient en cellules sécrétrices et en cellules myoépithéliales. La croissance et la différenciation des ébauches épithéliales nécessitent la présence de tissu dermique qui joue un rôle inducteur.

Période prénatale

À l'approche du terme, les mamelons qui sont de grosses papilles cutanées, se soulèvent par épaississement dermique. Des muscles lisses radiaires et

annulaires se différencient dans les mamelons. Après desquamation superficielle de l'épiderme, les canaux lobaires s'ouvrent.

Sous l'influence des hormones maternelles et placentaires, les glandes mammaires peuvent, dans les deux sexes, présenter une activité sécrétoire qui accompagne la crise génitale du nouveau-né. Cette sécrétion est connue sous le nom de « lait de sorcière ».

Chez le fœtus humain à terme, les mamelles sont identiques dans les deux sexes. Dans certaines espèces, comme les souris, il existe un dimorphisme sexuel des glandes mammaires dès avant la naissance.

Les différentes étapes sont résumées à la figure 7.7.

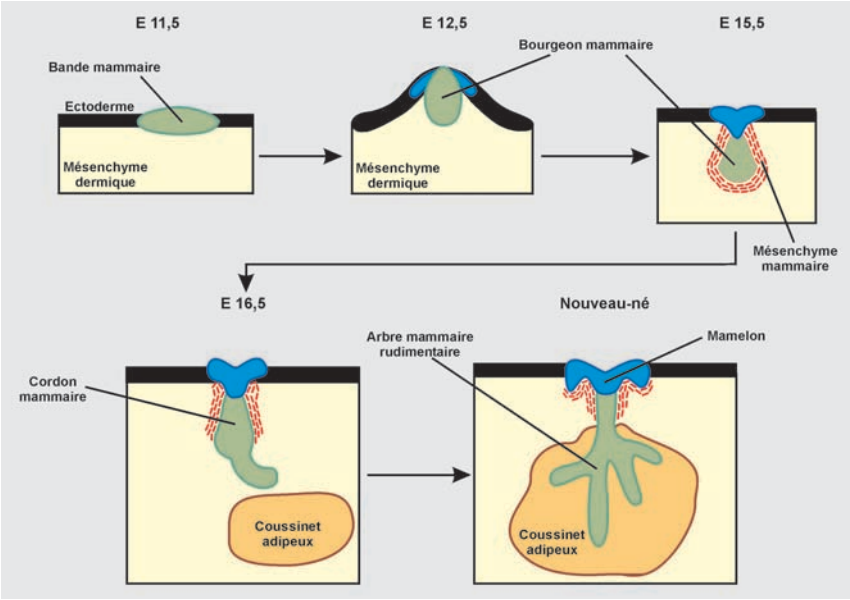


Figure 7.7 : Mécanismes de développement de la glande mammaire chez la souris (d'après Cowin, et coll., 2010)

Période postnatale

Du fait de l'absence de stimulation hormonale, la glande revient au repos et y reste jusqu'à la période prépubertaire. Au cours de la première année, le tissu conjonctif se développe. Il apparaît du tissu adipeux et des manchons conjonctifs périglandulaires se différencient. Durant toute l'enfance, la glande va rester quiescente, et sa croissance sera très lente.

Période pubertaire

Chez le garçon, la puberté ne modifie pas la glande, en dehors de phénomènes d'hypertrophie transitoires. Durant tout le reste de la vie, la glande conservera un aspect proche de celui de la période prépubertaire.

Dans le sexe féminin, au contraire, une croissance active se produit sous l'influence des hormones sexuelles ovariennes. L'œstradiol entraîne une prolifération canaliculaire et le développement du tissu adipeux. Les canaux et les culs de sacs pénètrent le conjonctif voisin qui achève de s'organiser autour des structures épithéliales.

Si une grossesse survient, une nouvelle phase de croissance amène la glande à son stade fonctionnel qui persiste le temps de l'allaitement. À la ménopause, la stimulation hormonale s'arrête et la glande évolue vers une atrophie de type prépubertaire.

Bibliographie

BAKER TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963, **158** : 417-433

BALINSKY BI. On the prenatal growth of the mammary gland rudiment in the mouse. *J Anat* 1950, **84** : 227-235

BOWLES J, KOOPMAN P. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction* 2010, **139** : 943-958

CHABOISSIER MC, KOBAYASHI A, VIDAL VI, LÜTZKENDORF S, VAN DE KANT HJ, et coll. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 2004, **131** : 1891-1901

CHEMES HE. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 2001, **24** : 2-7

COWIN P, WYSOLMERSKI J. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2** : a003251

DEFALCO T, CAPEL B. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009, **25** : 457-482

EDSON MA, NAGARAJA AK, MATZUK MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009, **30** : 624-712

FENG S, FERLIN A, TRUONG A, BATHGATE R, WADE JD, et coll. INSL3/RXFP2 signaling in testicular descent. *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1160** : 197-204

GUIGON CJ, COUDOUEL N, MAZAUD-GUITTOT S, FOREST MG, MAGRE S. Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology* 2005, **146** : 2992-3004

GUIGON CJ, MAGRE S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 2006, **74** : 450-458 Erratum in : *Biol Reprod* 2006, **75** : 660

HIRSHFIELD AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991, **124** : 43-101

KASHIMADA K, KOOPMAN P. SRY: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 2010, **137** : 3921-3930

LE BOUFFANT R, GUERQUIN MJ, DUQUENNE C, FRYDMAN N, COFFIGNY H, et coll. Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 2010, **25** : 2579-2590

MAZAUD GUITTOT S, GUIGON CJ, COUDOUEL N, MAGRE S. Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biol Reprod* 2006, **75** : 749-759

MCGEE EA, HSUEH AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000, **21** : 200-214

MIEUSSET R. Anomalies postnatales du développement de la spermatogenèse associées aux troubles de la migration testiculaire. *Andrologie*, 2010, **20** : 179-189

PANNETIER M, PAILHOUX E. FoxL2, the gatekeeper of ovarian identity. *Med Sci* (Paris) 2010, **26** : 470-473

PARMA P, RADI O, VIDAL V, CHABOISSIER MC, DELLAMBRA E, et coll. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006, **38** : 1304-1309

SALAZAR-MARTINEZ E, ROMANO-RIQUER P, YANEZ-MARQUEZ E, LONGNECKER MP, HERNANDEZ-AVILA M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health* 2004, **3** : 8

8

Malformations des voies génitales chez l'homme et la femme

Dans ce chapitre ne seront abordées que les malformations en relation avec l'exposition à des perturbateurs endocriniens et plus particulièrement celles survenant dans le « syndrome de dysgénésie testiculaire » ou TDS (abréviation de l'expression « *Testicular dysgenesis syndrome* » pour les anglophones) (figure 8.1). Le TDS est un syndrome associant chez les sujets masculins au moins deux des anomalies suivantes :

À la naissance, puis toute la vie (sauf correction chirurgicale) :
- pénis mal formé (avec notamment hypospadias) ;
- pénis anormalement petit ;
- testicule non descendu (cryptorchidie, généralement chirurgicalement corrigée dans l'enfance) ;

À partir de l'adolescence :
- moindre qualité du sperme ;
- moindre quantité de spermatozoïdes produits par millilitre de sperme ;
- nombre anormal (à très élevé) de spermatozoïdes mal formés ;
- sous fécondité (ou infertilité) masculine ;
- avec éventuellement cancer du testicule.

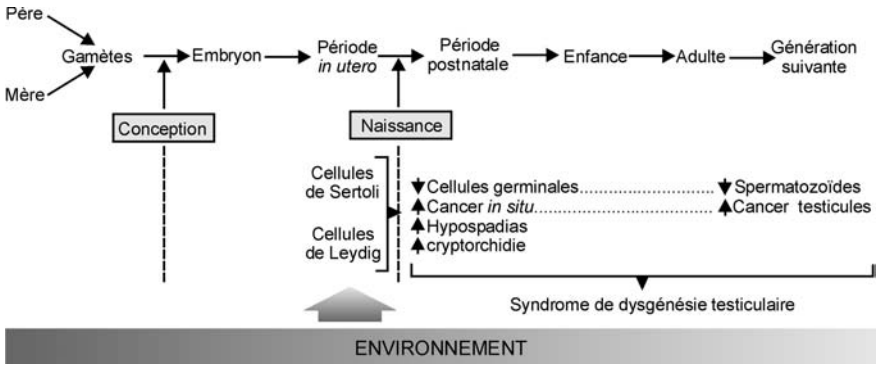


Figure 8.1 : Effets de l'environnement sur la fonction de reproduction chez l'homme

Ces symptômes semblent pouvoir être rapportés à une modification (inhibition) de la production de testostérone à un moment critique de la vie fœtale qui est celui du lancement du « programme » de « masculinisation » de l'embryon (Sharpe et Skakkebaek, 2008).

L'environnement doit être considéré au sens large, de nombreux agents exogènes pouvant moduler la fonction de reproduction. L'exposition à un facteur exogène peut être présente durant la vie *in utero* (exemple du DES) mais également durant l'enfance (exemple Seveso, Mocarelli et coll., 1996) ou bien chez l'adulte (exemple le dibromochloropropane, Whorton et coll., 1979).

L'hypothèse du syndrome de dysgénésie testiculaire émise par Sharpe et Skakkebæk (2008) permet d'intégrer différentes conséquences constatées dans les études épidémiologiques (baisse de la production de spermatozoïdes, augmentation de la fréquence de l'hypospade, de la cryptorchidie et du cancer du testicule). Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que l'action de perturbateurs endocriniens chez l'animal a pu mettre en évidence en partie des manifestations allant dans le même sens. Cependant, l'exposition de l'adulte peut avoir pour conséquence des perturbations de la fonction de reproduction. Les facteurs de risques peuvent être multiples chez l'adulte (exposition à des substances chimiques, abordées par exemple dans cet ouvrage, mais également à des facteurs physiques par exemple l'hyperthermie ou des styles/habitudes de vie comme par exemple le tabac...). Il semble nécessaire d'avoir à l'esprit la notion d'une possible continuité décrite dans ce schéma et la notion d'expositions multiples à différentes périodes de la vie, de la conception jusqu'à la ou les générations suivantes. Enfin, savoir comment intervient le fond génétique reste une vraie question. Le schéma n'aborde que la fonction de reproduction masculine et se réduit à certains critères ; d'autres critères peuvent être envisagés comme par exemple la modification du taux de testostérone ou les altérations de l'ADN du gamète.

Hypospadias

L'hypospadias est une affection des voies génitales externes relativement fréquente (3/1 000 naissances), c'est l'affection la plus fréquente du pénis, son incidence oscille selon les auteurs entre 1 à 8/1 000 enfants de sexe masculin. Il s'agit d'une anomalie de la fermeture de la gouttière urogénitale à la face inférieure du pénis (figure 8.2). D'un point de vue embryologique, l'hypospadias pénien et pénoscrotal résultent d'une anomalie de la fermeture de la gouttière urogénitale issue de la lame urétrale d'origine entoblastique, qui se ferme d'arrière en avant en constituant un tube jusqu'à la base du gland. L'étiologie est multifactorielle, outre les facteurs génétiques, le rôle nocif d'un traitement hormonal au cours des premiers mois de la grossesse ou encore une

altération de la synthèse de la testostérone (ou de ses dérivés) et/ou d'une anomalie des récepteurs pour ces hormones ont été incriminés.

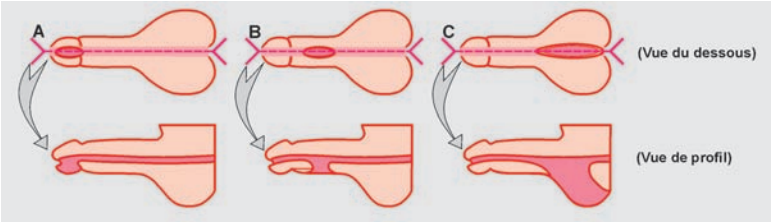


Figure 8.2 : Différentes formes d'hypospadias

Plusieurs formes anatomiques ont été mises en évidence. L'hypospadias balanique se caractérise par une ouverture du méat urétral sous le gland. L'hypospadias pénien se caractérise par une ouverture de l'urètre au milieu du pénis. L'hypospadias pénoscrotal résulte en une fusion incomplète des plis labioscrotaux et se caractérise par une ouverture de l'urètre à la face inférieure du pénis au niveau du scrotum.

Cryptorchidie /ectopie testiculaire

Descente testiculaire

Entre le troisième mois et le terme de la grossesse, les testicules descendent depuis la région lombaire (à la face ventro-médiane du mésonéphros) vers le futur scrotum. Ce déplacement se fait sous l'action conjuguée de la croissance et de facteurs hormonaux (testostérone, INSL3), le gubernaculum testis jouant un rôle décisif. Ce cordon ligamentaire apparaît au cours de la 7e semaine suite à la dégénérescence du mésonéphros en substitution au ligament inguinal. L'extrémité céphalique du gubernaculum se fixe au testicule, alors que son extrémité caudale s'attache dans la région des bourrelets labioscrotaux (futur scrotum).

Au même moment apparaît une petite évagination du péritoine appelée processus vaginal, le long duquel le testicule va glisser à travers le canal inguinal, dans sa position définitive.

Entre la 7e et la 12e semaine de gestation, le gubernaculum se raccourcit le long de sa portion extra-inguinale et attire les testicules, leurs canaux déférents et leurs vaisseaux vers le bas. Les testicules restent dans le voisinage du canal inguinal du 3e au 7e mois puis entrent dans le canal inguinal. Ils ne pénètrent dans le scrotum qu'autour du 9e mois. L'action de la testostérone et des androgènes (hormones sexuelles stéroïdes masculines), semble favoriser cette dernière phase de la descente testiculaire.

La cryptorchidie (non descente des testicules en position scrotale) touche environ 30 % des nouveau-nés prématurés et 4 % des nouveau-nés à terme. Il ne faut pas confondre la cryptorchidie avec l'ectopie testiculaire où le testicule est dans une position anormale, conséquence d'une migration aberrante. La cryptorchidie peut être unilatérale ou bilatérale dans 20-40 % des cas.

L'étiologie de cette affection reste inconnue mais semble liée à une production insuffisante d'androgènes. Les testicules restent dans la cavité abdominale, ou n'importe où sur leur trajet de migration normale, le plus souvent dans le canal inguinal (60 % des cas). Si les testicules cryptorchides sont en général normaux à la naissance, des altérations histologiques apparaissent fréquemment au cours de la première année de vie (incidence du cancer testiculaire accrue de 20-40 %, risque de stérilité).

Malformations des voies génitales chez la femme

Endométriose

L'endométriose est caractérisée par la présence de tissu endométrial ectopique (localisé en dehors de l'utérus), soit au niveau des ovaires, des trompes, des ligaments utérins, du septum recto-vaginal, du péritoine pelvien. Comme l'endomètre utérin, ce tissu est soumis au cycle menstruel. L'étiologie de l'endométriose reste toujours très controversée.

Selon la théorie de la métaplasie, l'épithélium cœlomique, s'invaginant pour former les canaux de Müller (qui vont donner naissances à l'utérus et donc à l'endomètre), garde la potentialité de se différencier en tissu endométrial. Cependant, le principal mécanisme responsable de l'endométriose pelvienne pourrait être le reflux menstruel de débris endométriaux et leur implantation secondaire au niveau pelvien. Des mécanismes génétiques et immunologiques mettant en jeu l'adhérence cellulaire sont probablement également impliqués.

Bibliographie

MOCARELLI P, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, PATTERSON DG JR, NEEDHAM LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *The Lancet* 1996, **348** : 409

SHARPE RM, SKAKKEBAEK NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 2008, **89** : e33-e38

WHORTON D, MILBY TH, KRAUSS RM, STUBBS HA. Testicular function in DBCP exposed pesticide workers. *J Occup Med* 1979, **21** : 161-166

9
Puberté

La puberté est la période de la vie au cours de laquelle apparaissent un changement dans le rythme de croissance somatique, la maturation des gonades, et le développement des caractères sexuels secondaires. La puberté se termine lorsque la fonction de reproduction est acquise. La puberté représente l'ensemble des phénomènes physiques, psychiques, mentaux, affectifs qui caractérisent le passage de l'état d'enfant à l'état d'adulte aboutissant à la fonction de reproduction.

L'apparition de la puberté est sous la dépendance de facteurs internes (hormonaux) mais aussi de l'alimentation. On rapporte par exemple comme un fait clairement établi que l'âge des premières menstruations pour les filles européennes est tombé de 15-16 ans en moyenne en 1900, à 12-13 ans dans les années 1970 tout en précisant qu'en 1900 les jeunes filles de milieux aisés avaient leurs premières règles à l'âge de 12-13 ans. Pour les garçons, la puberté est plus tardive (Kaufman, 2010).

Chez la femme

Chez la jeune fille impubère, les concentrations en hormones hypophysaires de type gonadostimulines (LH et FSH) sont très faibles, les concentrations en hormones ovariennes (œstradiol, œstrone…) extrêmement faibles, tout comme les sécrétions endocrines hypothalamiques de gonadolibérines (GnRH). La mise en place de la fonction endocrine sexuelle hypothalamique (et donc du système nerveux) semble être le facteur déclenchant de la mise en place des cycles sexuels féminins.

La puberté correspond à la maturation des organes génitaux (caractères sexuels primaires) et l'apparition de particularités spécifiques au sexe (caractères sexuels secondaires). Ces transformations mettent plusieurs années à s'accomplir. L'âge du début des modifications morphologiques et la vitesse de passage d'un stade de développement au suivant varient beaucoup d'un enfant à l'autre. Cependant, une fois initiés, ces changements pubertaires (développement des organes génitaux externes (OGE) et des caractères sexuels secondaires (CSS)) se réalisent selon une séquence chronologique bien établie et pour laquelle la classification, en cinq stades, de Tanner (1962) sert cliniquement de référence.

Le premier signe de puberté est en général, l'apparition des seins (thélarche), suivie 6 mois plus tard d'une pilosité sur les grandes lèvres, puis sur le pubis (pubarche). La pigmentation des mamelons apparaît un an plus tard. La pilosité axillaire se développe rapidement, en général entre le moment du pic de croissance maximal et l'apparition des règles (ménarche). La ménarche est un événement tardif de la puberté (âge moyen de 13 ans, plus ou moins 4 mois selon les populations) mais n'en marque pas la fin. En effet, les premiers cycles menstruels sont anovulatoires et il se passe environ 5 ans avant qu'un taux de fécondité normal ne soit atteint (vers 18 ans) (DiVall et coll., 2009).

Les cycles menstruels débutent à la puberté et s'achèvent à la ménopause. Les menstruations marquent le début de chaque cycle. Dans l'ovaire, les follicules à antrum dont l'évolution était bloquée depuis la vie fœtale, reprennent leur développement.

Les glandes mammaires se développent à partir de 10/11 ans et atteignent le stade adulte à l'âge de 15 ans. Les différents stades du développement pubertaire sont cotés de 1 (stade pré-pubère) à 5 (stade adulte) selon la classification de Tanner.

Le développement des seins selon Tanner :
- pas de seins, évolution éventuelle du mamelon ;
- apparition du bourgeon mammaire vers 11 ans et demi ;
- apparition de la pigmentation du mamelon et de l'aréole, de profil la saillie mammaire est bien visible à l'âge de 12 ans et demi ;
- projection antérieure de l'aréole et du mamelon vers 13 ans ;
- anatomie de type adulte, retour de l'aréole dans le plan de la surface du sein et sillon sous mammaire distinct, à l'âge de 15 ans environ.

Chez l'homme

À partir d'environ 11 ans (puberté), des cellules de Leydig de nouveau en activité sont décelables dans le tissu interstitiel. Leur sécrétion d'androgènes (testostérone) est sous la dépendance des hormones hypophysaires et FSH, elles-mêmes commandées par l'unique hormone hypothalamique la GnRH, comme chez la femme. La sécrétion de GnRH chez l'homme adulte est rythmique (un pic toutes les 90 minutes). La testostérone agit en retour (*feed-back* négatif) sur la sécrétion des hormones hypophysaires, indirectement en agissant sur l'hypothalamus (la testostérone diminue la fréquence des pics de GnRH) et directement sur l'hypophyse (la testostérone inhibe la sécrétion de LH). La testostérone agit sur les cellules de Sertoli notamment par l'intermédiaire d'une protéine de liaison des androgènes elle-même sécrétée par les cellules de Sertoli sous l'action de la FSH. Les cellules de Sertoli sécrètent aussi l'inhibine, une hormone inhibant la sécrétion de FSH par l'hypophyse. La testostérone, hormone masculinisante, intervient sur l'ensemble de l'appareil génital et est responsable du maintien des caractères sexuels secondaires (pilosité, croissance,

répartition des masses graisseuses et musculaires, timbre de la voix, sécrétions des glandes sébacées, développement des muscles squelettiques...).

Le premier signe pubertaire est l'augmentation de volume des testicules. Ensuite la pilosité pubienne apparaît, le scrotum se pigmente et le pénis grandit. Le développement des testicules est souvent asymétrique. L'apparition de la pilosité faciale et corporelle est plus tardive : duvet de la lèvre supérieure vers 15 ans, sur les joues vers 16 ans, puis sur le menton. La pilosité thoracique ne sera complète que plus tard encore (25 ans). L'apparition d'une gynécomastie (développement du tissu mammaire) est très fréquente (70 % des garçons normaux entre 13 et 16 ans). Elle est en général réduite à un disque sous-aréolaire mou, de 2 à 3 cm de diamètre, qui involue spontanément au bout de deux ans mais persiste chez 35 % des hommes adultes normaux. Le développement du larynx (cartilage cricoïde et muscles du larynx) est plus important que chez la fille. La mue de la voix commence en général vers 13 ans et demi et se termine environ un an plus tard.

Puberté précoce

La puberté précoce se définit comme l'apparition des caractères sexuels secondaires avant l'âge de 9 ans chez la fille, et avant l'âge de 10 ans chez le garçon. La puberté précoce est 9 fois plus fréquente chez la fille que chez le garçon, mais contrairement à celui-ci, elle est rarement lésionnelle (6 % des cas). La vraie puberté précoce est en rapport avec un trouble primitif de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Ibáñez et coll., 2009). Les fausses pubertés précoces sont en rapport avec un trouble primitif des gonades ou des surrénales. Ainsi, outre l'échographie pelvienne chez la fille, qui permet d'affirmer rapidement le diagnostic de puberté précoce sur l'aspect des organes génitaux internes, l'imagerie est fondamentale dans le diagnostic étiologique. L'échographie permet de plus de découvrir une tumeur primitive sécrétante de l'ovaire responsable de la puberté précoce.

Bibliographie

DIVALL SA, RADOVICK S. Endocrinology of female puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009, **16** : 1-4

IBAÑEZ L, DIAZ R, LOPEZ-BERMEJO A, MARCOS MV. Clinical spectrum of premature pubarche: links to metabolic syndrome and ovarian hyperandrogenism. *Rev Endocr Metab Disord* 2009, **10** : 63-76

KAUFFMAN AS. Coming of age in the kisspeptin era: sex differences, development, and puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2010, **324** : 51-63

TANNER JM. Growth at Adolescence. 1962 Thomas, Springfield, IL

10
Fonctionnement des ovaires

L'ovaire assure deux grandes fonctions : l'ovogenèse (production d'ovocytes aptes à la fécondation) et la stéroïdogenèse (synthèse hormonale). Lors de l'ovogenèse, les ovogonies vont subir une réduction du nombre de chromosomes pour passer de 46 chromosomes (nombre spécifique de l'espèce humaine) à 23 chromosomes lors de la méiose.

Le follicule, lors des derniers jours de sa croissance, synthétise des œstrogènes et plus particulièrement de l'œstradiol. Cette synthèse augmente progressivement jusqu'à l'ovulation. Après l'ovulation, la synthèse d'œstradiol diminue et le corps jaune sécrète essentiellement de la progestérone. Ces deux grandes fonctions de l'ovaire peuvent être altérées par l'action des perturbateurs endocriniens. Il existe des différences dans le fonctionnement des ovaires entre espèces, certaines ne produisent qu'un ovocyte à chaque cycle (femme, brebis, vache, jument) alors que d'autres sont poly-ovulantes (rongeurs).

Cycles œstriens et menstruels

Il existe deux types de cycles chez les mammifères : les cycles œstriens, avec des chaleurs à chaque cycle et les cycles menstruels (primates) avec des menstruations (saignements) (Driancourt et coll., 1991). L'œstrus et la menstruation permettent de caractériser respectivement le début de chaque cycle. L'ovulation a lieu au début du cycle œstrien et au milieu du cycle menstruel.

Les cycles sexuels se composent de deux phases : la phase folliculaire (de durée variable en fonction des espèces (tableau 10.I) qui correspond à la période de croissance terminale du ou des follicules jusqu'à l'ovulation, et une phase lutéale qui s'étend de l'ovulation jusqu'à la régression fonctionnelle du corps jaune.

Selon les espèces, les cycles peuvent être mono ovulatoires avec une phase folliculaire courte (brebis) ou longue (jument), ou bien une poly ovulation se produit au cours d'un cycle long (truie) ou court (rongeurs). La durée des phases folliculaires varie d'une espèce à l'autre mais reste généralement courte par rapport à la phase folliculaire des cycles menstruels des primates. En effet, seuls les cycles œstriens présentent en permanence des follicules de taille pré ovulatoire.

Chez la femme et la rate, l'ovaire ne porte de follicules ovulatoires que pendant la période pré ovulatoire du cycle. En revanche, chez la vache, la brebis et la jument, les follicules pré ovulatoires se succèdent au cours du cycle, ce qui raccourcit d'autant la phase préparatoire des follicules. Enfin, il existe certains mammifères (chamelle, lapine, hase, chatte) chez lesquels c'est l'accouplement qui induit une décharge ovulante de LH et qui provoque l'ovulation.

Tableau 10.I : Caractéristiques chronologiques des cycles sexuels de quelques mammifères (d'après Driancourt et coll., 1991)

Espèce	Durée du cycle (jours)	Durée de la phase lutéale (jours)	Durée de la phase folliculaire (jours)	Durée de l'œstrus	Moment de l'ovulation
Vache	21 (18-24)	17 (15-19)	4 (2-5)	20 h	12-15 h après fin des chaleurs
Brebis	17 (15-19)	15 (14-16)	2 (2-3)	24 h	18-36 h après début des chaleurs
Jument	21 (16-30)	14 (12-15)	7 (4-15)	6 j (2-14)	6 j (2-14) après début des chaleurs
Rate	4 -5	1-2	3	9 j	8-10 h après début des chaleurs
Femme	28 (24-35)	14 (12-17)	14 (12-18)		Milieu du cycle

Production cyclique des gamètes

Lors de chaque cycle, l'un des deux ovaires libère un ovocyte. Au début du cycle, un follicule cavitaire qualifié de dominant se développe rapidement lors de la phase folliculaire (environ 14 jours). L'ovulation marque la fin de la phase folliculaire. Elle correspond à l'éclatement du follicule mûr ou follicule de De Graaf et à l'expulsion de l'ovocyte. La phase lutéale (environ 14 jours) est caractérisée par la transformation du follicule en corps jaune. S'il n'y a pas de fécondation, ce corps jaune régresse progressivement en fin de cycle.

Contrôle hypothalamo-hypophysaire des sécrétions ovariennes

Le fonctionnement des ovaires est contrôlé par deux formations situées à la base du cerveau : l'hypothalamus et l'hypophyse. L'hypothalamus sécrète une hormone, la GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*), qui va stimuler l'hypophyse (figure 10.1). En réponse, l'hypophyse sécrète deux hormones (gonadotrophines), la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) et la LH (*Luteinizing Hormone*), qui vont à leur tour agir sur les ovaires. Par leurs sécrétions hormonales les ovaires vont réguler le fonctionnement de l'hypothalamus et de l'hypophyse (rétro-contrôle). Les modalités du contrôle varient en fonction du stade de développement des follicules.

Le système de commande de la sécrétion des hormones sexuelles est le même chez la femme que chez l'homme mais les modalités sont différentes.

L'hypophyse sécrète de façon cyclique deux gonadostimulines : FSH, qui active le recrutement d'un follicule dominant ainsi que sa croissance et donc stimule indirectement la sécrétion d'œstradiol par les cellules folliculaires, et la LH, qui déclenche l'ovulation et assure la transformation des cellules folliculaires en corps jaunes (figure 10.2). C'est le premier niveau de contrôle.

La sécrétion des gonadostimulines est sous contrôle hypothalamique. La GnRH (gonadolibérine) est sécrétée de façon pulsatile. Les pulses de GnRH stimulent les cellules cibles antéhypophysaires et déclenchent les pulses de FSH et LH.

Le rythme de sécrétion des neurones à GnRH varie très nettement en cours de cycle et il est maximal en période pré ovulatoire. C'est le deuxième niveau de contrôle.

Les taux d'œstrogène et de progestérone sont relativement définis pour chaque femme, mais ils varient au cours du cycle. Le système de commande hypothalamo-hypophysaire doit être soumis à un ensemble de rétrocontrôles particuliers.

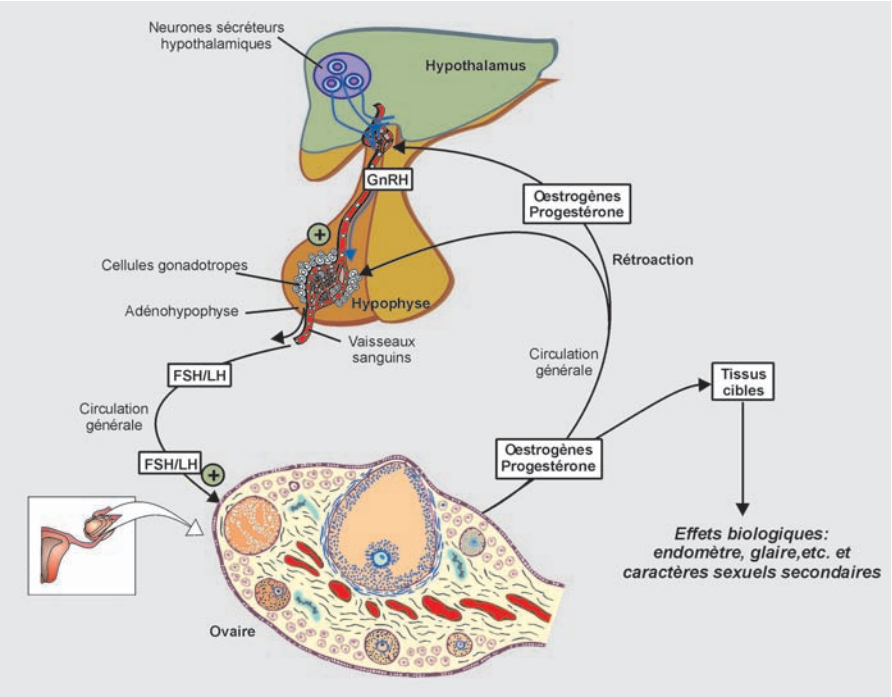


Figure 10.1 : Complexe hypothalamo-hypophyse-gonade chez la femelle

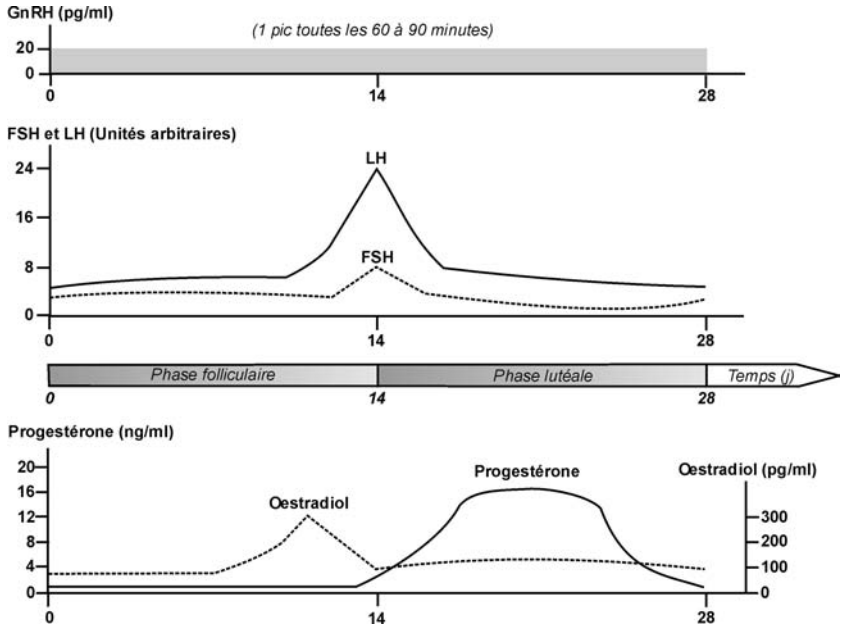


Figure 10.2 : Profils hormonaux au cours du cycle menstruel chez la femme

Le complexe hypothalamo-hypophysaire détecte, à tout moment, les variations des taux sanguins d'hormones ovariennes et modifie son activité en fonction des taux détectés. C'est généralement un rétrocontrôle négatif c'est-à-dire qu'une hausse du taux d'œstrogène entraîne une diminution de la sécrétion de gonadostimulines. La production massive d'œstradiol par le follicule mûr sensibilise les cellules antéhypophysaires ce qui déclenche une augmentation de la sécrétion des gonadostimulines (LH). Dans ce cas, on parle de rétrocontrôle positif.

Bibliographie

DRIANCOURT MA, THATCHER WW, TERQUI M, ANDRIEU D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the œstrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domest Anim Endocrinol* 1991, **8** : 209-221

11
Fonctionnement des testicules

La spermatogenèse et la spermiogenèse sont les processus cellulaires qui produisent des cellules sexuelles mâles matures. Ces processus ont lieu dans les tubes séminifères des testicules de l'homme pubère, comme le montre la figure 11.1. La maturation épididymaire, se déroulant lors du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, est indispensable pour l'obtention d'un gamète mature physiologiquement fonctionnel.

Spermatogenèse

La spermatogenèse se déroule chez l'homme au sein des tubules séminifères et est un phénomène continu chez l'homme adulte. Schématiquement, le testicule peut être divisé en deux compartiments : le compartiment tubulaire où se déroule la spermatogenèse et le compartiment interstitiel, situé entre les tubules séminifères.

Dans le compartiment interstitiel vont être retrouvés plusieurs éléments cellulaires dont les cellules de Leydig qui sont à l'origine de la sécrétion de testostérone, hormone, qui permettra la masculinisation de l'individu et notamment le développement des organes androgéno-dépendants, l'acquisition et le maintien des caractères sexuels secondaires. D'autres éléments cellulaires vont également être retrouvés dans le compartiment interstitiel comme des macrophages, des précurseurs de cellules de Leydig ou des cellules péritubulaires disposées contre le tubule séminifère. Enfin, des capillaires lymphatiques peuvent être mis en évidence ainsi que des capillaires sanguins, à endothélium continu, capillaires qui participent à la barrière hémo-testiculaire.

Dans le compartiment tubulaire, deux grands types de cellules vont être retrouvés : les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale.

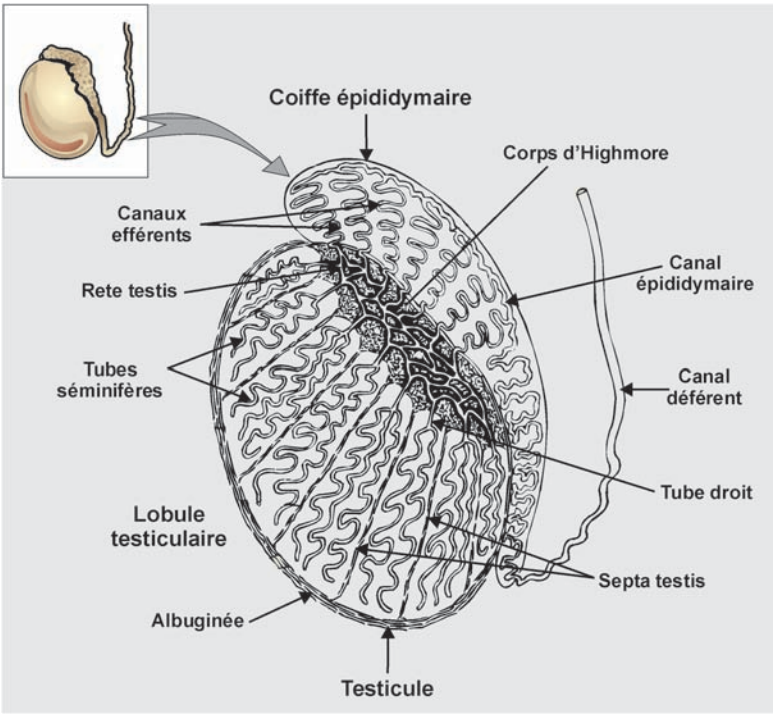


Figure 11.1 : Schéma du testicule et de l'épididyme, lieux de la spermatogenèse et de la maturation du gamète mâle, chez l'homme

Les cellules de Sertoli sont de grandes cellules à noyaux encochés qui vont de la membrane basale à la lumière du tube séminifère. Ce sont les cellules de soutien de la spermatogenèse et le nombre de cellules de Sertoli serait un élément important en relation avec le nombre de gamètes produit chez l'homme. Ces cellules de Sertoli acquièrent un caractère différencié à la puberté, elles sont non seulement les cellules de soutien mais également les cellules nourricières de la spermatogenèse notamment de par le nombre de facteurs de croissances sécrétés, de par les contacts physiques avec les cellules germinales. Elles ont un rôle essentiel dans les régulations paracrines (dans le testicule) mais également endocrines (hors testicule, par exemple sur l'hypophyse). Enfin les cellules de Sertoli participent grâce aux jonctions serrées au pôle basal du tube séminifère, à la barrière hémo-testiculaire.

Les cellules germinales sont composées de trois grandes catégories de cellules correspondant à des phases de la spermatogenèse. La phase de division implique les spermatogonies et permet la continuité de la spermatogenèse chez l'adulte. La phase de méiose concerne les spermatocytes et permet la création de cellules haploïdes et le brassage génétique. Enfin, pendant la phase de différenciation, la spermatide va subir un processus majeur de différenciation aboutissant au spermatozoïde.

Phase de division

La phase de division met en jeu les spermatogonies qui sont des cellules diploïdes (2n chromosomes) sièges de divisions cellulaires classiques. Il existe trois sortes de spermatogonies selon leur degré de différenciation ou de division : Ad, noyau sombre (*dark*), cellule souche de la spermatogenèse, en contact avec la membrane basale ; Ap, noyau pâle, sans vacuole nucléaire qui par mitose donne des spermatogonies B ; B, noyau à chromatine en agrégat périphérique, contact avec membrane basale moins important que pour Ad ou Ap. Chez l'homme adulte, les spermatogonies Ad peuvent être considérées comme des cellules souches de la spermatogenèse ; elles sont quiescentes et ne rentrent en division probablement que s'il existe un déficit cellulaire en aval. Elles peuvent se diviser pour donner des spermatogonies Ap. Les spermatogonies Ap vont se diviser pour donner deux Ap ou pour donner deux spermatogonies B. On estime qu'elles donnent une B tous les 16 jours. Les spermatogonies B se divisent et donnent les spermatocytes I. Le fait que les spermatogonies Ad se divisent en Ap fait qu'il existe un véritable renouvellement de ces cellules permettant ainsi un maintien continu de la spermatogenèse. Ces cellules sont situées dans le compartiment basal du tube séminifère, les Ad et Ap étant en contact étroit avec la membrane basale.

Phase de méiose

La phase de méiose met en jeu les spermatocytes. Le spermatocyte I issu de la division des spermatogonies B est le siège, pendant la période qui précède la prophase de la première division de la méiose, d'une activité de synthèse très importante qui se traduit par une augmentation du cytoplasme et un doublement de la qualité d'ADN (2n chromosomes, 4ADN). Cette cellule (parfois appelé auxocyte) est la plus volumineuse de la spermatogenèse observée sur les coupes tissulaires. Elle est le siège de la première division de la méiose, la mitose réductionnelle qui entraîne la séparation des chromosomes homologues appariés, pour aboutir au spermatocyte II, cellule haploïde ayant n chromosomes mais 2ADN. Ce spermatocyte est rapidement le siège de la mitose équationnelle de la méiose qui va avoir pour résultat une cellule haploïde à n chromosomes et n ADN : la spermatide.

Phase de différenciation

La phase de différenciation appelée spermiogenèse, concerne la spermatide qui est une cellule ronde issue de la mitose équationnelle de la méiose. Cette cellule ronde subit une différenciation très poussée, avec notamment plusieurs événements d'importance. Il s'agit tout d'abord de la mise en place de l'acrosome, à partir de la confluence de vésicules sécrétées par l'appareil de Golgi, qui va venir recouvrir les deux tiers antérieurs du noyau. Pendant la transformation nucléaire, les histones sont remplacées par des protéines de transition puis par des protamines, ce qui va avoir pour conséquences une extrême

compaction du matériel nucléaire et une protection du génome. Les histones représenteront, dans le spermatozoïde, seulement 20 % environ des protéines nucléaires. Il est à noter lors de ces déplacements, l'induction de cassures dans l'ADN qui doivent être réparées pour avoir un génome normal. Par ailleurs, le noyau du spermatozoïde va acquérir une forme spécifique de l'espèce.

Se produit ensuite la mise en place du flagelle, l'axonème du flagelle ayant pour origine le centriole distal, le centriole proximal qui joue un rôle après la fécondation se situant juste en dessous de la pièce connective assurant la cohésion entre la tête et le flagelle du spermatozoïde. Puis un manchon de mitochondrie se met en place au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle. Enfin, la plus grande partie du cytoplasme est phagocytée par la cellule de Sertoli lors de la spermiation c'est-à-dire la libération du spermatozoïde dans la lumière du tubule séminifère.

Plusieurs points doivent être soulignés :
- la continuité de la spermatogenèse chez l'adulte grâce au renouvellement des spermatogonies Ap ;
- la durée de la spermatogenèse spécifique de l'espèce, elle est chez l'homme de 74 jours ;
- l'existence de ponts intercytoplasmiques entre les populations cellulaires ;
- l'existence de cellules souches quiescentes, les spermatogonies Ad, pouvant être réactivées ;
- la nécessité du transit épididymaire qui a une importance majeure en physiologie car c'est lors du transit épididymaire que le spermatozoïde va achever sa maturation.

Il est dès lors compréhensible qu'une altération de la physiologie épididymaire, par un facteur environnemental, peut avoir des conséquences sur les fonctions du spermatozoïde pouvant avoir un effet y compris sur le développement embryonnaire.

Enfin, le dernier point concerne la barrière hémo-testiculaire qui est constituée par la paroi non fenêtrée des capillaires, les cellules péri-tubulaires, la membrane basale du tubule séminifère et la cellule de Sertoli au niveau des jonctions. Cette barrière a un rôle sélectif et protège par là même les cellules haploïdes qui sont situées dans le compartiment adluminal du tubule séminifère.

Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire

Le « chef d'orchestre » de la fonction testiculaire est la production pulsatile de GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) par des neurones de l'hypothalamus, production très augmentée à la période pubertaire, alors que s'installe la fonction testiculaire. La GnRH provoque la sécrétion hypophysaire, elle-même pulsatile, de deux hormones, la FSH et la LH (figure 11.2).

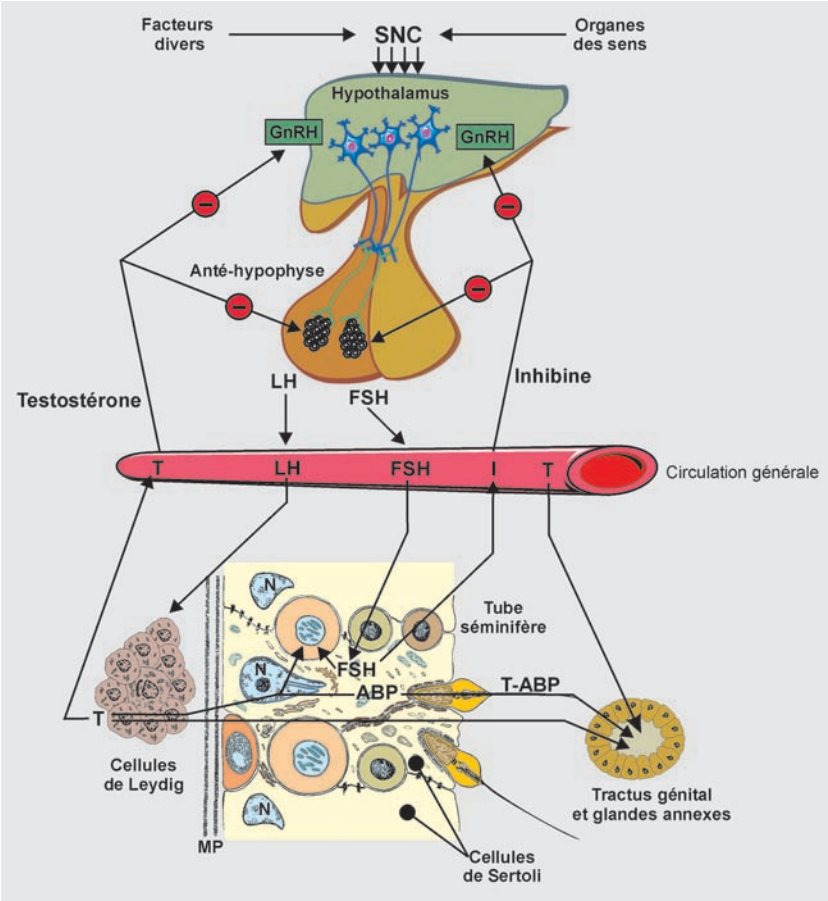


Figure 11.2 : Complexe hypothalamus-hypophyse-testicule

SNC : système nerveux central ; T : testostérone ; I : inhibine ; ABP : *Androgen Binding Protein* ; MP : membrane plasmique

Schématiquement, la FSH, en association avec la testostérone, permet le développement des cellules de Sertoli et la spermatogenèse donc la fonction exocrine du testicule (excrétion des spermatozoïdes) alors que la LH assure la multiplication des cellules de Leydig et la sécrétion de testostérone, fonction endocrine du testicule.

La stéroïdogenèse est commandée par la LH qui se fixe sur des récepteurs membranaires des cellules de Leydig ; les cellules de Leydig sécrètent alors des androgènes, essentiellement de la testostérone (T) ; la testostérone pénètre dans le compartiment tubulaire où elle se lie à une glycoprotéine de liaison, l'ABP (*Androgen Binding Protein*) pour conditionner le développement de l'épithélium séminal et le bon fonctionnement des voies génitales ; la testostérone libre passe dans le sang et exerce deux actions : une action positive sur

le tractus génital et les glandes annexes et principalement après action de l'aromatase et transformation en œstradiol, un rétrocontrôle sur la sécrétion de LH et FSH, soit indirectement sur les neurones hypothalamiques, soit directement sur les cellules gonadotropes hypophysaires.

La FSH se fixe sur des récepteurs membranaires des cellules de Sertoli et joue un triple rôle : elle active la spermatogenèse par l'intermédiaire du cytoplasme sertolien ; elle stimule la formation d'ABP et provoque la sécrétion d'inhibine, hormone exerçant un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH, soit sur les neurones hypothalamiques en diminuant la sécrétion de la GnRH, soit directement sur les cellules gonadotropes hypophysaires.

Il existe également des sécrétions autocrines – la sécrétion de la testostérone exerce une rétro-inhibition sur l'activité des enzymes de la stéroïdogenèse à l'intérieur de la cellule de Leydig – et des sécrétions paracrines entre la cellule de Sertoli et la cellule de Leydig. La testostérone peut être aromatisée en œstradiol dans la cellule de Sertoli, l'œstradiol inhibera par voie paracrine la sécrétion de testostérone dans la cellule de Leydig (et par voie endocrine la sécrétion de FSH).

Comme tous les organes, les testicules, les voies génitales et les glandes annexes sont sous double contrôle, hormonal (neuro-endocrinien) et nerveux (système nerveux sympathique).

Régulation thermique

Chez les mammifères, une spermatogenèse normale nécessite une hypothermie physiologique : la température des testicules doit être plus basse que la température corporelle. Chez l'homme, une température testiculaire d'environ 33-35 °C permet un fonctionnement optimal de la spermatogenèse. Cette hypothermie relative (euthermie testiculaire) est maintenue grâce au système vasculaire particulier qui permet, par des échanges thermiques à contre courant, un refroidissement du sang artériel arrivant au testicule et également grâce au système scrotal, qui par ces capacités d'adaptation, va permettre les échanges entre le scrotum et le milieu extérieur et ainsi refroidir le contenu scrotal. Par ailleurs, il faut noter que l'épididyme est également un organe thermosensible nécessitant un environnement thermique abaissé. Les conséquences d'une élévation de la température épididymo-testiculaire ont été étudiées chez l'animal et l'homme. Chez l'homme, une faible augmentation de la température (n'atteignant toutefois pas la température corporelle) a pour conséquence une altération quantitative de la spermatogenèse, diminution majeure de la quantité de spermatozoïdes produits avec à l'extrême une azoospermie, mais également une altération qualitative de la spermatogenèse (Mieusset et Bujan, 1995).

Cette notion de thermodépendance de la fonction épididymo-testiculaire concernant la production des gamètes et leur qualité doit être bien connue

d'autant plus que les perturbations des systèmes de régulation thermique, certaines habitudes de vie ou l'exposition professionnelles à des sources de chaleur peuvent modifier l'équilibre thermique qui permet un fonctionnement optimal.

Bibliographie

MIEUSSET R, BUJAN L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995, **18** : 169-184

12
Modifications épigénétiques

La notion d'épigénétique a été pour la première fois formulée dans les années 1950 par Conrad Waddington comme « tout ce qui relie le génotype au phénotype », à savoir comment une simple information codée peut être modulée en fonction de stimuli développementaux et environnementaux et donner lieu à une identité cellulaire ou individuelle complexe. La définition moléculaire actuelle s'entend comme « l'étude des changements héritables (mitotiquement ou méiotiquement) et réversibles de l'expression génique qui n'impliquent pas de changement de la séquence d'ADN » (Holliday, 1990).

L'information épigénétique correspond à des modifications biochimiques qui vont cibler soit la molécule d'ADN, soit les protéines histones et en particulier leurs extrémités amino-terminales qui sortent librement du nucléosome. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est ciblée spécifiquement sur les cytosines et fait intervenir des enzymes spécialisées, les ADN-méthyltransférases ou DNMT, qui existent au nombre de 4 chez l'Homme (Goll et Bestor, 2005). Les protéines DNMT3A, DNMT3B et leur co-facteur DNMT3L sont responsables de l'établissement des profils de méthylation, tandis que DNMT1 est une enzyme de maintenance qui assure la propagation des profils de méthylation à chaque cycle de réplication. Lorsque localisée en densité suffisante sur les régions promotrices des gènes, la méthylation de l'ADN entraîne une répression des gènes associés. Elle agirait directement par encombrement stérique, en empêchant la liaison de facteurs de transcription, ou indirectement par le recrutement de protéines spécialisées, appelées protéines de liaison à l'ADN méthylé (MBD) et qui agiraient elles-mêmes au sein de complexe de remodelage de la structure chromatinienne. Les modifications post-traductionnelles des histones composent un système de régulation beaucoup plus complexe, combinant plus de 70 sites de modifications identifiés à ce jour (Kouzarides, 2007) et quelques centaines de protéines catalysant l'ajout ou le retrait de ces modifications. Les modifications d'histones agissent pour certaines directement sur la conformation chromatinienne, comme cela a été démontré pour l'acétylation, mais aussi indirectement par le recrutement de protéines chromatiniennes accessoires. D'une manière générale, l'acétylation des résidus lysine indique un état actif, tandis que la méthylation des lysines et arginines peut avoir un effet activateur ou répresseur suivant leur position. Pour ne citer que les plus connues, les marques de méthylation sur les lysines en position 9 et 27 de l'extrémité de l'histone H3 (respectivement H3K9 et H3K27) sont répressives, la marque de

méthylation en H3K4 est activatrice. Les relations épistatiques entre méthylation de l'ADN et modifications des histones sont bi-directionnelles, traduisant une boucle de renforcement mutuel : la méthylation de l'ADN d'une séquence influence les profils de modifications des histones associées, mais à l'inverse, la réaction de méthylation de l'ADN dépend aussi de profils de modifications d'histones pré-existants. La combinatoire de modifications épigénétiques à l'échelle du génome entier compose l'épigénome.

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

Des anomalies épigénétiques peuvent survenir à la suite de mutations génétiques dans des enzymes impliquées dans le répertoire de modifications épigénétiques. On peut citer pour exemple le syndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromeric instability and Facial anomalies*), une pathologie de défaut constitutif de méthylation de l'ADN, associée à des mutations dans le gène codant pour l'ADN-méthyltransférase DNMT3B (Xu et coll., 1999). Des anomalies épigénétiques, ou épimutations, peuvent aussi être la conséquence d'une altération d'un programme développemental ou cellulaire donné, et leur incidence est augmentée par des facteurs clairement identifiés : le régime alimentaire, l'âge, le cancer, le comportement maternel, le contexte hormonal, les infections virales ou bactériennes, l'exposition à des agents chimiques présents dans l'environnement (Van Vliet et coll., 2007). Ces altérations de méthylation peuvent être locales, ou concerner des régions plus étendues du génome et signent généralement dans ce cas une perturbation de l'expression des ADN-méthyltransférases.

Pour illustration de la modulation possible des profils épigénétiques, des analyses familiales étendues et suivies sur plusieurs années ont permis de révéler la dérive épigénétique des individus au cours de leur vie (Sandovici et coll., 2005). Les couples de jumeaux monozygotes constituent un modèle d'étude typique de l'influence de l'environnement et de l'expérience de

chacun sur son patrimoine épigénétique. Avec l'âge, les jumeaux monozygotes apparaissent de plus en plus discordants épigénétiquement, accumulant au cours de leur vie des différences de profils de méthylation, dans les cellules du sang circulant (Fraga et coll., 2005 ; Kaminsky et coll., 2009). Ces variations épigénétiques ne sont cependant pas pour autant synonymes de pathologies et, comme dans le cas de variations génétiques, ont dans leur majorité un impact neutre sur le phénotype. Il existe cependant également des cas de discordance pathologique entre jumeaux monozygotes, qui signent l'acquisition de profils épigénétiques non conformes et délétères chez l'un d'eux. Un cas classique est celui du syndrome de Wiedeman-Beckwith, où l'anomalie de méthylation a pu être identifiée sur une région de contrôle de gènes soumis à empreinte parentale uniquement chez les jumeaux atteints (Orstavik et coll., 1995). Le défaut épigénétique serait dans ce cas apparu de manière quasi concomitante avec la scission de l'embryon précoce. Il existe également des individus totalement chimères pour cette condition, indiquant ici encore l'acquisition assez précocement au cours du développement d'une anomalie de méthylation dans une cellule ou quelques cellules, suivie de leur expansion clonale. Enfin, l'existence d'allèles « épistables » a permis de mettre en évidence chez la souris l'influence possible du régime alimentaire de la mère, et en particulier la disponibilité en folates qui sont utilisés comme donneurs de groupements méthyles pour la cellule, sur le profil de méthylation de ces allèles chez les petits exposés *in utero* à ce régime (Wolff et coll., 1998 ; Waterland et coll., 2006). Le statut de méthylation de ces allèles est également sensible à des expositions *in utero* au bisphénol A (Dolinoy et coll., 2007).

D'une manière générale, un mode d'action épigénétique est suspecté lorsque des perturbations précoces en vie embryonnaire, fœtale ou néonatale induisent un phénotype adulte. Lorsque ces perturbations atteignent la lignée germinale, ces effets peuvent se manifester à la génération suivante, dans la descendance produite de ces gamètes épigénétiquement anormaux. On parle alors d'effets multigénérationnels (figure 12.1). Si ces anomalies persistent encore à la génération suivante et sont donc à nouveau transmis par la lignée germinale qui n'a pas elle-même été exposée, on parle alors d'effets transgénérationnels. Comme développé dans le paragraphe suivant, la reprogrammation épigénétique extensive que connaît la lignée germinale des mammifères rend cependant ce type de phénotype transgénérationnel peu probable, dans l'espèce humaine en particulier.

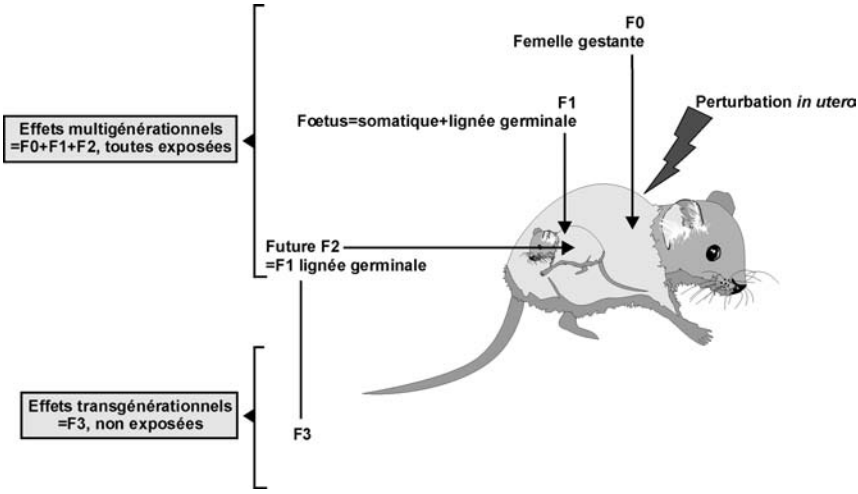


Figure 12.1 : Altérations épigénétiques de la lignée germinale et effets sur la descendance

Une femelle gestante F0 exposée à des perturbateurs épigénétiques porte un fœtus F1 dont les lignées somatiques et germinales seront directement exposées. L'individu F2 descend lui-même directement de cette lignée F1 exposée, et les effets observés en F1 sont donc qualifiés de multigénérationnels, s'ils atteignent à la fois les générations F1 et F2. En revanche, la lignée germinale de F2 n'a pas été exposée, de même que l'individu F3 issu de cette lignée germinale. Des effets observés en F3 après exposition de la F1 *in utero* signent ainsi une imprégnation épigénétique irréversible, qui se transmet de façon autonome au cours des générations.

Développement germinal et méthylation de l'ADN : remise à zéro et acquisition du programme germinal

Tout programme de différenciation normal s'accompagne de profils épigénétiques spécifiques. Les cellules germinales des mammifères subissent notamment des remaniements importants de leurs profils de méthylation au cours de leur émergence et de leur différenciation vers la formation de gamètes (Trasler, 2006). Des études sur le modèle murin ont démontré que la programmation épigénétique de la lignée germinale est particulièrement importante pour l'acquisition de l'empreinte génomique (ou empreinte parentale), et le maintien de l'intégrité génomique via la répression des éléments transposables du génome (Bourc'his et coll., 2001 ; Bourc'his et Bestor, 2004).

Les transitions de méthylation que connaît la lignée germinale sont étroitement liées au programme de différenciation de la gonade (figure 12.2). L'entrée des cellules germinales dans les ébauches gonadiques (qui a lieu vers 10,5 jours de gestation chez la souris) déclenche ainsi un effacement des profils de méthylation : d'un statut globalement méthylé de 60 %, la cellule

germinale primordiale passe à un taux de 7 % (Popp et coll., 2010). Cette relaxation coïncide avec l'acquisition de la pluripotence, et donc de la potentialité développementale et épigénétique du gamète à donner lieu au développement d'un individu dans sa totalité. Cette phase d'effacement permet aussi potentiellement de remettre à zéro dans la nouvelle lignée germinale toute anomalie de méthylation ou épimutation acquise, et empêche ainsi sa transmission à la génération suivante. En d'autres termes, cette reprogrammation empêche a priori tout effet transgénérationnel des épimutations. Suite à cette déméthylation s'effectue un programme de reméthylation, sous la gouvernance des enzymes DNMT3A, DNMT3B et du co-facteur DNMT3L, qui s'exécute selon des cinétiques différentes en fonction du sexe de l'individu, signant cette fois l'importance de l'environnement gonadique sexué sur ce processus (Schaefer et coll., 2007 ; Bourc'his et Proudhon, 2008). Chez le mâle, l'expression du gène de détermination sexuelle *SRY* porté par le chromosome Y, déclenche la reméthylation germinale en période fœtale, dès le jour 13,5 de gestation chez la souris. Les cibles identifiées de cette reméthylation mâle sont les éléments transposables qui comptent pour la moitié du génome, et les gènes soumis à empreinte paternelle. Ces profils de méthylation mâle sont ensuite maintenus et perpétués dans la lignée germinale après la naissance, au cours de la méiose et jusqu'à la formation de spermatozoïdes matures. Chez la femelle, la déméthylation est d'abord suivie par l'entrée en méiose, initiée vers 13,5 jours de gestation. La reméthylation n'a lieu qu'après la naissance chez la souris femelle, à chaque cycle d'ovulation, dans les cohortes d'ovocytes dictyés en phase de maturation. Une taille ovocytaire critique de 60 microns, et donc un stade assez avancé de maturation folliculaire, a été identifiée comme déterminante pour déclencher l'initiation de ce processus (Lucifero et coll., 2004). Les cibles identifiées de cette reméthylation femelle sont les éléments transposables, les gènes soumis à empreinte maternelle et plusieurs gènes importants pour le développement (Borgel et coll., 2010). L'acquisition en vie adulte des profils de méthylation ovocytaire est connue pour être sensible à des perturbations hormonales ou l'induction de programmes accélérés de maturation ovocytaire comme ceux mis en jeu dans les protocoles de superovulation en assistance médicale à la procréation (Fauque et coll., 2007). Du fait de cette chronologie de reméthylation postnatale, la lignée germinale femelle pourrait cependant être moins exposée à des altérations survenant en période *in utero*, comparée à la lignée germinale mâle qui subit à la fois la déméthylation et la reméthylation avant la naissance.

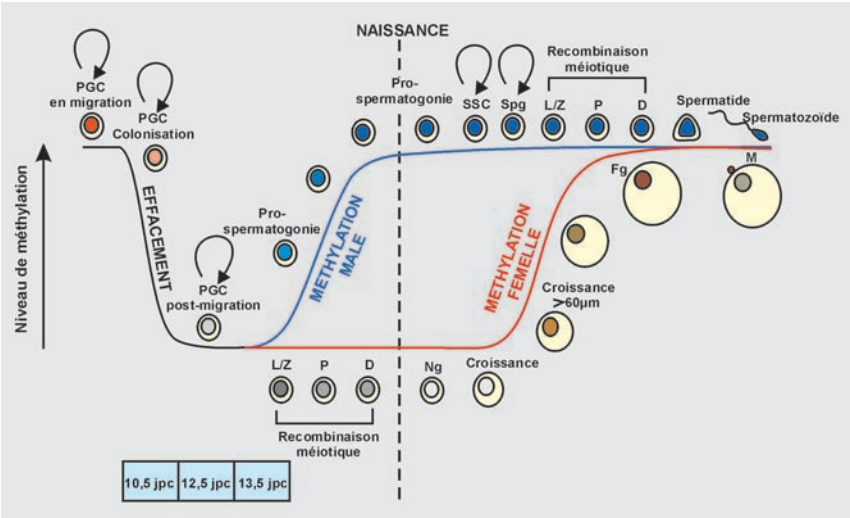


Figure 12.2 : Cinétique d'acquisition de la méthylation de l'ADN au cours du développement de la lignée germinale mâle et femelle chez la souris (d'après Bourc'his et Proudhon, 2008)

Les cellules germinales primordiales (PGC) subissent un effacement de leurs profils de méthylation déclenché par leur arrivée dans les ébauches gonadiques vers 10,5 jours post coïtum (jpc). À 12,5 jpc, ces cellules sont globalement déméthylées, alors que le gène *SRY* commence à s'exprimer dans la gonade des individus mâles. À 13,5 jpc, les cellules germinales mâles reméthylent leur génome. Les cellules germinales femelles rentrent à ce stade en méiose, et ne se reméthylent qu'après la naissance, à chaque cycle d'ovulation, dans les cohortes successives d'ovocytes qui entrent en phase de croissance finale.
SSC : cellules souches des spermatogonies ; L/z : leptotène/zygotène ; P : pachytène ; D : diplotène ; Spg : spermatogonie ; Fg : ovocyte mûr ; Ng : ovocyte quiescent ; M : ovocyte en métaphase II de la méiose, après ovulation

En accord avec la remise à zéro complète des profils de méthylation dans la lignée germinale précoce des mammifères, il n'existe à présent aucun cas prouvé chez l'Homme de transmission de caractères épigénétiques acquis à la descendance. Une limitation technique majeure s'impose : même si une anomalie de méthylation de l'ADN apparaît comme héréditaire au sein d'une famille, il faudrait séquencer le génome entier de l'individu et de ses apparentés pour prouver le caractère autonome de cette épimutation, ou en d'autres termes qu'il ne s'agit pas d'une mutation génétique qui a pour effet secondaire cette anomalie de méthylation. Cependant, il ne peut être totalement exclu à l'heure actuelle que l'effacement dans la lignée germinale soit total, qu'il n'existe pas un niveau basal de méthylation persistante. Chez la souris, les allèles épistables mentionnés plus haut auraient des effets transgénérationnels potentiels (Morgan et coll., 1999 ; Rakyan et coll., 2003). Ces cas sont en fait associés à des séquences qui sont connues pour ne pas être totalement remises à zéro dans la lignée germinale des rongeurs, les séquences IAP (*Intracisternal A Particles*)

(Hajkova et coll., 2002). De tels exemples de séquences résistantes à la reprogrammation germinale, assez uniques il faut tout de même le mentionner, pourraient également exister dans le génome humain. Cette idée suscite de nombreux fantasmes et des rapports sur l'existence de tels phénomènes se multiplient de nos jours. Cependant, une analyse rigoureuse du mécanisme moléculaire en cause et la preuve formelle qu'il s'agit bien d'une épimutation héréditaire et non pas des effets confondants doivent être absolument apportés avant toute conclusion (Youngson et Whitelaw, 2008 ; Galvani et Bourc'his, 2008).

Compte tenu du rôle crucial de la gonade pour la diffusion de signaux déclenchant la déméthylation et la reméthylation dans les deux sexes, il apparaît clair qu'une exposition précoce à des pertubateurs endocriniens est susceptible d'altérer les profils transcriptionnels et épigénétiques des organes cibles des androgènes et œstrogènes, et aussi directement ou indirectement la programmation épigénétique de la lignée germinale. Ci-dessous sont décrits des cas avérés d'altération épigénétique faisant suite à une exposition à des perturbateurs endocriniens connus, avec des effets potentiels sur la reproduction.

Perturbations « épigénotoxiques » liées à la reproduction

Des perturbateurs endocriniens présents dans une large gamme d'insecticides et fongicides, ont des effets adverses connus sur le système reproductif femelle et mâle après exposition *in utero*. L'étude de leurs effets épigénétiques a souvent été limitée à quelques séquences cibles, choisies pour leur implication dans le développement de la gonade ou du tractus génital en général. Très peu d'études ont étudié directement les profils épigénétiques de la lignée germinale, malgré la documentation d'effets multi- voire transgénérationnels potentiels. Compte tenu de la plus grande facilité d'investigation de la méthylation de l'ADN, ces études sont pour l'instant limitées principalement à cette modification épigénétique.

L'étude la plus médiatisée a été celle développée en réponse à une exposition chez la femelle gestante au fongicide vinclozoline au potentiel antiandrogénique, en prenant pour modèle le rat de fond génétique mixte Sprague-Dawley (Anway et coll., 2005). Des expositions par injection de doses élevées de ce composant induisent une variété de phénotypes somatiques et d'anomalies de la spermatogenèse chez le mâle, qui peuvent se perpétuer sur 3 générations (Anway et coll., 2006a ; Anway et coll., 2006b), signant ainsi une imprégnation possible de la lignée germinale. Des anomalies multi-loci dans le sens d'hyper- et d'hypométhylations ont tout d'abord été reportées dans le testicule mais également dans une gamme de tissus somatiques sur plusieurs générations (Chang et coll., 2006), avant que cette étude ne soit rétractée pour cause de non reproductibilité des données (Retraction : Chang et coll., 2009). Une étude plus récente des profils de méthylation à

grande échelle établis sur le sperme de pools d'individus sur 3 générations après exposition *in utero* de la F1 à la vinclozoline reporte quelques anomalies modestes de méthylation, toujours dans le sens à la fois de pertes et de gains (Guerrero-Bosagna et coll., 2010). La méthode de « poolage » ne permet cependant pas de distinguer les effets directs sur la F1 des effets transmis aux générations suivantes. Basées sur l'étude nucléotidique de 16 séquences identifiées comme altérées dans leur méthylation, les anomalies sembleraient préférentiellement toucher une séquence consensus, pourtant appauvrie en cytosines, qui sont les cibles de la méthylation de l'ADN. Pour conclure sur ce chapitre de la vinclozoline, des effets anti-androgéniques sur la génération directement exposée *in utero* ont été reportés par plusieurs études, avec une altération des organes génitaux externes, mais pas d'effet sur la spermatogenèse (Matsuura et coll., 2005). De plus, les phénotypes épigénétiques transgénérationnels n'ont pas été reproduits, notamment par une équipe de recherche affiliée au producteur allemand de vinclozoline, après un protocole de gavage de la mère gestante plutôt que d'injection et sur une lignée congénique de rats, la lignée Wistar (Schneider et coll., 2008).

L'exposition à 100 mg/kg/j de méthoxychlore, un composé utilisé dans les pesticides en remplacement du DTT, en période fœtale et néonatale induit chez le rat femelle une dysfonction ovarienne, associée à des hyperméthylations modestes d'une cohorte de gènes importants pour le développement ovarien, tel que le récepteur beta aux œstrogènes (Zama et Uzumcu, 2009). Les effets sur l'expression de ces cibles n'ont malheureusement pas été analysés, d'où la difficulté de conclure sur une participation réelle de ces anomalies de méthylation sur le phénotype. Ces hyperméthylations seraient accompagnées d'une hausse de l'expression de l'ADN-méthyltransférase DNMT3B. Chez le mâle, une exposition en vie adulte au méthoxychlore n'altère pas les paramètres spermatiques, mais induit de modestes anomalies de méthylation des gènes soumis à empreinte. En revanche, l'exposition *in utero* conduit à une réduction de 30 % du nombre de spermatozoïdes, qui sont de plus porteurs d'anomalies sévères de méthylation sur les gènes soumis à empreinte paternelle (dans le sens d'une hypométhylation) et aussi à empreinte maternelle (dans le sens d'une hyperméthylation) (Stouder et Paoloni-Giacobino, 2010). Ces effets sur la lignée germinale s'estompent en génération F2 pour disparaître en F3, n'impliquant donc pas de transmission transgénérationnelle.

En réponse à une exposition *in utero* chez la souris à l'agent pro-œstrogénique diéthylstilbœstrol, une diminution de l'expression et une légère hyperméthylation ont été rapportées sur une cible du récepteur aux œstrogènes, le gène *Hx10a,* en association avec une expression accrue des DNMT3A et DNMT3B (Bromer et coll., 2009). Cette hyperméthylation pourrait participer au développement de tumeurs épithéliales de l'utérus observées chez les souris femelles ainsi exposées. Une étude menée sur plusieurs générations suggère que ces effets pourraient s'étendre à la lignée germinale des souris exposées *in utero*, puisque leurs descendants présentent le même phénotype de

susceptibilité accrue à ce type de tumeur de l'utérus (Newbold et coll., 1998 ; Newbold et coll., 2006). Cet effet est cependant atténué en proportion par rapport à la génération directement exposée. Chez le mâle, l'exposition *in utero* au diéthylstilbœstrol induit aussi des tumeurs du tractus génital, chez le mâle directement exposé mais également chez la descendance mâle de femelles exposées (Newbold et coll., 2000). Aucune étude des profils épigénétiques n'a cependant été réalisée pour permettre de conclure sur l'origine et la transmission possible de ce phénotype chez le mâle.

Bibliographie

ANWAY M, CUPP A, UZUMCU M, SKINNER MICHAEL K. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* 2005, **308** : 1466-1469

ANWAY MD, LEATHERS C, SKINNER MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 2006a, **147** : 5515-5523

ANWAY MD, MEMON MA, UZUMCU M, SKINNER MK. Transgenerational effect of the endocrine disruptor vinclozolin on male spermatogenesis. *J Androl* 2006b, **27** : 868-879

BORGEL J, GUIBERT S, LI Y, CHIBA H, SCHÜBELER D, SASAKI H, et coll. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat Genet* 2010, **42** : 1093-1100

BOURC'HIS D, BESTOR TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004, **431** : 96-99

BOURC'HIS D, PROUDHON C. Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008, **282** : 87-94

BOURC'HIS D, XU GL, LIN CS, BOLLMAN B, BESTOR TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001, **294** : 2536-2539

BROMER JG, WU J, ZHOU Y, TAYLORHS. Hypermethylation of HOXA10 by in utero diethylstilbœstrol exposure: an epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology* 2009, **150** : 3376-3382

CHANG HS, ANWAY MD, REKOW SS, SKINNER MK. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* 2006, **147** : 5524-5541. Retraction : *Endocrinology* 2009, **150** : 2976

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

FAUQUE P, JOUANNET P, LESAFFRE C, RIPOCHE MA, DANDOLO L, et coll. Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 2007, **7** : 116

FRAGA MF, BALLESTAR E, PAZ MF, ROPERO S, SETIEN F, BALLESTAR ML, et coll. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** : 10604-10609

GALVANI A, BOURC'HIS D. Heritable epimutations: a case study in humans. *Med Sci* (Paris) 2008, **24** : 473-474

GOLL MG, BESTOR TH Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005, **74** : 481-514

GUERRERO-BOSAGNA C, SETTLES M, LUCKER B, SKINNER MK. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS One* 2010, **5** : e13100

HAJKOVA P, ERHARDT S, LANE N, HAAF T, EL-MAARRI O, REIK W, et coll. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002, **117** : 15-23

HOLLIDAY R. Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1990, **65** : 431-471

KAMINSKY ZA, TANG T, WANG SC, PTAK C, OH GH, WONG AH, et coll. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet* 2009, **41** : 240-245

KOUZARIDES T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* 2007, **131** : 822

LUCIFERO D, MANN MR, BARTOLOMEI MS, TRASLER JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004, **13** : 839-849

MATSUURA I, SAITOH T, ASHINA M, WAKO Y, IWATA H, et coll. Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin. *J Toxicol Sci* 2005, **30 (no spec)** : 163-188

MORGAN HD, SUTHERLAND HG, MARTIN DI, WHITELAW E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 1999,**23** : 314-318

NEWBOLD RR, HANSON RB, JEFFERSON WN, BULLOCK BC, HASEMAN J, MCLACHLAN JA. Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbœstrol. *Carcinogenesis* 1998, **19** : 1655-1663

NEWBOLD RR, HANSON RB, JEFFERSON WN, BULLOCK BC, HASEMAN J, MCLACHLAN JA. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbœstrol. *Carcinogenesis* 2000, **21** : 1355-1363

NEWBOLD RR, PADILLA-BANKS E, JEFFERSON WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* 2006, **147** : S11-S17

ORSTAVIK RE, TOMMERUP N, EIKLID K, ORSTAVIK KH. Non-random X chromosome inactivation in an affected twin in a monozygotic twin pair discordant for Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* 1995, **56** : 210-214

POPP C, DEAN W, FENG S, COKUS SJ, ANDREWS S, et coll. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 2010, **463** : 1101-1105

RAKYAN VK, CHONG S, CHAMP ME, CUTHBERT PC, MORGAN HD, et coll. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100** : 2538-2543

SANDOVICI I, KASSOVSKA-BRATINOVA S, LOREDO-OSTI JC, LEPPERT M, SUAREZ A, et coll. Interindividual variability and parent of origin DNA methylation differences at specific human Alu elements. *Hum Mol Genet* 2005, **14** : 2135-2143

SCHAEFER CB, OOI SK, BESTOR TH, BOURC'HIS D. Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* 2007, **316** : 398-399

SCHNEIDER S, KAUFMANN W, BUESEN R, VAN RAVENZWAAY B. Vinclozolin-the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. *Reprod Toxicol* 2008, **25** : 352-360

STOUDER C, PAOLONI-GIACOBINO A. Specific transgenerational imprinting effects of the endocrine disruptor methoxychlor on male gametes. *Reproduction* 2010, Nov 9. (Epub ahead of print)

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

VAN VLIET J, OATES NA, WHITELAW E. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007, **64** : 1531-1538

WATERLAND RA, DOLINOY DC, LIN JR, SMITH CA, SHI X, TAHILIANI KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 2006, **44** : 401-406

WOLFF GL, KODELL RL, MOORE SR, COONEY CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 1998, **12** : 949-957

XU GL, BESTOR TH, BOURC'HIS D, HSIEH CL, TOMMERUP N, et coll. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999, **402** : 187-191

YOUNGSON NA, WHITELAW E. Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, **9** : 233-257

ZAMAAM, UZUMCU M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology* 2009, **150** : 4681-4691

13
Conclusions et perspectives de recherche

Il existe un décalage dans le temps entre la différenciation mâle et femelle. La différenciation mâle est plus précoce, ce qui implique qu'une exposition à un moment donné du développement *in utero* n'aura pas les mêmes effets chez un fœtus mâle ou femelle.

La différenciation du tractus génital mâle est beaucoup plus dépendante de la production d'hormones que ne l'est celle de la femelle. En effet, les ovaires du fœtus ne sont pas indispensables à la féminisation de l'organisme alors que les testicules le sont pour la masculinisation. Cela est à prendre en considération pour comprendre pourquoi certaines substances induisent des effets plus marqués chez le mâle que chez la femelle. Tout dérèglement de la fonction hormonale précoce aura certainement des conséquences plus marquées chez le mâle que chez la femelle.

En revanche, la disparition ou la diminution brutale d'un grand nombre de cellules germinales aura des répercussions sur la différenciation de l'ovaire alors que l'absence de spermatogonies n'influence pas la différenciation du testicule.

Le stock de follicules primordiaux formés dans l'ovaire fœtal est fixe et déterminé pour toute la vie reproductive de la femelle tandis que la spermatogenèse produit des gamètes de façon continue de la puberté à la sénescence chez le mâle. Certaines altérations survenues très tôt chez la femelle seront donc irréversibles et auront des effets à très long terme (20 à 30 ans) sur la fertilité.

Autre élément de réflexion, il existe des différences importantes entre espèces dans le déroulement de la différenciation sexuelle et dans les mécanismes qui les régulent. Les rongeurs ne représentent pas l'ensemble des mammifères et ont des particularités qui en font souvent une exception plus qu'un modèle universel.

Les différentes étapes du développement ovarien et testiculaire, bien que globalement similaires chez tous les mammifères, présentent des variations importantes entre espèces et ne se déroulent pas pendant des périodes similaires (figures 13.1 et 13.2).

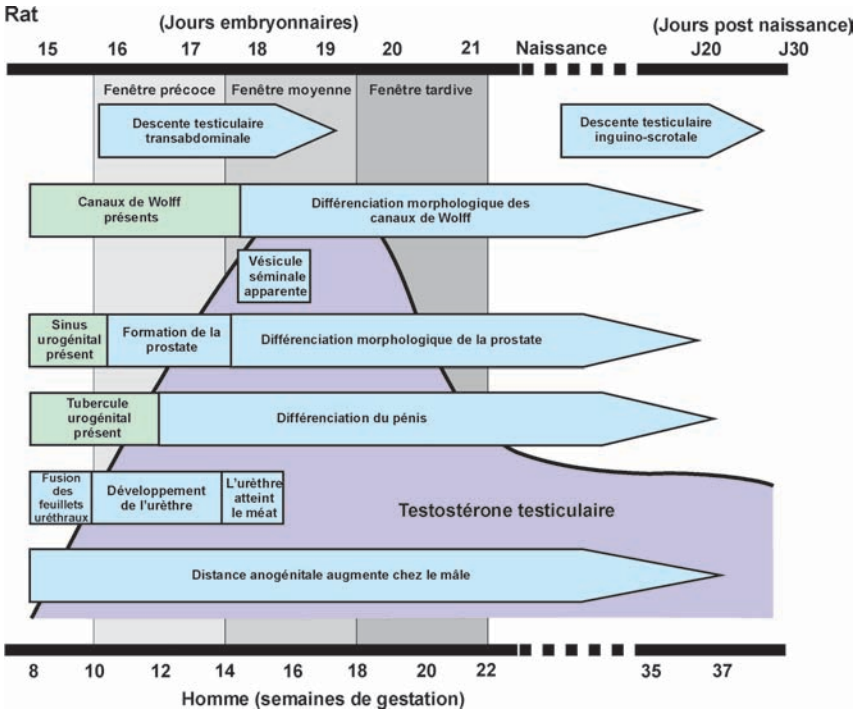


Figure 13.1 : Diagramme représentant les principales périodes du développement du tractus génital mâle chez l'humain et le rat, en relation avec le niveau de production de testostérone (d'après Welsh et coll., 2008)

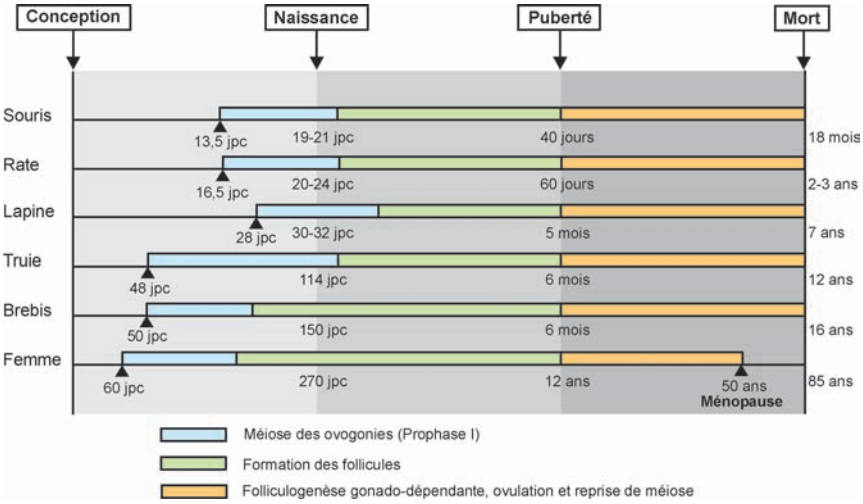


Figure 13.2 : Comparaison des périodes de différenciation ovarienne chez différents mammifères (d'après Monniaux et coll., 2009)

Il existe également des différences physiologiques au niveau du développement et de la fonction reproductive entre mammifères qui rendent l'extrapolation entre rongeurs et espèce humaine parfois difficile. Citons comme exemple l'ouverture vaginale qui signe le début de la puberté chez la souris mais qui n'existe pas chez les primates. À l'inverse, l'endométriose n'existe que chez les primates.

Par ailleurs, les rongeurs sont des animaux poly-ovulants ; à chaque cycle une dizaine, voire plus, de follicules vont arriver à l'ovulation et une dizaine d'ovocytes seront produits. Les mécanismes qui régulent la folliculogenèse et l'ovulation sont donc différents chez le rat ou la souris et dans les espèces mono-ovulantes comme l'homme ou les ruminants.

Les rongeurs naissent beaucoup plus immatures que la plupart des autres mammifères, ce qui limite l'extrapolation des expositions reçues après la naissance (exposition par le lait, le changement de la taille de la portée). La période néonatale du rongeur correspond du point de vue du développement à la fin de la grossesse chez l'homme. En conséquence, la correspondance entre l'ontogénèse du développement ovarien par exemple, et le développement du système nerveux central (SNC) diffère entre l'homme et le rat, de telle sorte que des perturbations durant la gestation n'auront pas le même impact sur le développement du SNC.

Les rongeurs naissent en nombre largement plus élevé ce qui augmente la variabilité quant à l'exposition individuelle.

Par ailleurs, le micro-milieu hormonal du fœtus *in utero* (par exemple une femelle entourée de deux mâles dans l'utérus) peut avoir un effet significatif sur la physiologie après la naissance et peut entraîner un processus de « masculinisation » du fœtus femelle (Brown et coll., 1984 ; Ryan et Vandenbergh, 2002). Ces facteurs ajoutent de la variabilité individuelle difficile à contrôler quand il s'agit d'étudier des effets « faibles ». Aujourd'hui encore, le *design* des modèles développementaux chez le rongeur n'est pas constant à travers la littérature scientifique : pour les tests spécifiques soit on utilise seulement des descendants mâles par portée, soit on prend 1-2 descendants au hasard. Cependant, le test proposé d'un-deux rejetons par portée comme *design* représentatif de la portée reste discutable surtout à la lumière des données sur le micro-milieu hormonal. Comme alternative, le test de toute la portée avec la moyenne de 10 rejetons par portée rend les expériences difficilement réalisables.

Il est donc clair qu'il faut être prudent pour extrapoler des résultats obtenus chez la souris à l'homme et prendre en compte les différences chronologiques et physiologiques qui existent entre les deux espèces. D'autres modèles animaux peuvent se révéler plus pertinents que les rongeurs, notamment ceux qui ont des durées de gestation et de vie longue, qui sont mono-ovulants et ne portent qu'un seul petit par portée, comme par exemple les ruminants.

Les effets d'exposition *in utero* à des substances chimiques peuvent se révéler à très long terme et parfois s'atténuer avec le temps. Il est donc indispensable de

réaliser des études longitudinales avec plusieurs moments d'investigation (à la naissance, au sevrage, à la puberté, à l'âge adulte). L'intervalle de temps entre l'arrêt de l'exposition et le moment de l'étude doit être pris en compte car il peut expliquer une partie des résultats contradictoires de la littérature scientifique.

Des effets épigénétiques induits par des perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement ont été mis en évidence, illustrant l'impact potentiel de ces perturbateurs sur la programmation de la reproduction, par altération de la gonade, du tractus génital ou des cellules germinales. Cependant, ces études sont très limitées, en termes de couverture génomique (quelques gènes cibles ont été choisis pour leur implication physiologique) et de l'étendue des défauts identifiés. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'analyse non biaisée et à grande échelle d'anomalies épigénétiques induites *in utero* par l'exposition à de tels facteurs. De plus, aucune étude ne s'est penchée sur les effets potentiels sur les séquences transposables, dont la dérégulation peut avoir des incidences épigénétiques sur le contrôle de l'expression des gènes avoisinants, mais également des effets génétiques par leur capacité à se mobiliser et s'insérer dans le génome. Ce type d'étude est d'autant plus crucial si l'on considère que les séquences IAP, qui sont ces séquences qui échappent à la reprogrammation de la lignée germinale chez la souris, sont issues d'éléments transposables et sont les seules séquences connues actuellement pouvant sous-tendre des effets transgénérationnels.

Bibliographie

BROWN MJ, SCHULTZ GS, HILTON FK. Intrauterine proximity to male fetuses predetermines level of epidermal growth factor in submandibular glands of adult female mice. *Endocrinology* 1984, **115** : 2318-2323

MONNIAUX D, CARATYL A, CLEMENT F, DALBIES-TRAN R, DUPONT J, et coll. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères *Inra Productions Animales*, 2009, **22** : 59-76

RYAN BC, VANDENBERGH JG. Intrauterine position effects. *Neurosci Biobehav Rev* 2002, **26** : 665-678

WELSH M, SAUNDERS PT, FISKEN M, SCOTT HM, HUTCHISON GR, et coll. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 2008, **118** : 1479-90

III

Effets de xénobiotiques sur la reproduction

Introduction

La plupart des substances chimiques qui font l'objet de cette expertise sont identifiées comme des perturbateurs endocriniens (PE). Plusieurs définitions sont proposées pour les perturbateurs endocriniens. Selon la Commission européenne, un perturbateur endocrinien est une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets pathologiques sur l'organisme ou sur sa descendance à la suite d'une modification de la fonction hormonale (*European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife*, 1996). Cette définition fait à la fois référence à un mécanisme (modification de la fonction hormonale) et à l'existence d'un effet pathologique.

Selon l'Agence américaine de l'environnement (EPA), un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme (Kavlock et coll., 1996). La définition américaine ne fait pas mention d'un effet pathologique sur l'organisme ou sa descendance.

En pratique, la première définition pose des difficultés méthodologiques, car elle impose de connaître à la fois l'impact d'une substance à l'échelle fondamentale, et de vérifier que cette substance a un impact sur la survenue de pathologies passant par ce mécanisme.

Ces notions sont issues des nombreuses études sur les anomalies de la reproduction de diverses espèces animales dont l'homme, mettant en cause des contaminants environnementaux, des œstrogènes de synthèse (diéthylstilbœstrol, DES), des xéno-œstrogènes responsables également de cancers.

Dans les pathologies de la reproduction induites par des substances chimiques, on ne sait que très rarement quels sont les modes d'actions dans le tissu cible et l'on se réfère à un mode d'action prédit à partir de modèles d'étude *in silico*, biochimiques ou cellulaires.

Plusieurs mécanismes d'action peuvent entrer en jeu pour une même substance. Les mécanismes d'actions potentiels des perturbateurs endocriniens ne se limitent pas à la compétition pour la liaison d'une hormone à son récepteur nucléaire ni à l'inhibition de la biosynthèse des hormones. Il a également été proposé que ceux-ci puissent entrer en compétition pour la liaison à des protéines de transport ou altérer le métabolisme intracellulaire des hormones, moduler l'expression des co-activateurs des récepteurs nucléaires, la dégradation de ceux-ci ou encore modifier l'expression de gènes à travers des mécanismes épigénétiques.

Selon l'approche utilisée pour caractériser l'impact des substances sur la fonction de reproduction, différents types d'effets peuvent être mis en évidence. Au niveau le plus fondamental, les mécanismes moléculaires peuvent être exploréés : il s'agit notamment d'identifier les récepteurs nucléaires pouvant interagir avec la substance considérée et de rechercher les effets des substances sur les caractéristiques génétiques, sur l'expression des gènes (transcriptomique par exemple), ou l'expression de certaines protéines (métabolomique). Au niveau cellulaire, l'impact des substances se caractérise par des perturbations des phénomènes d'apoptose, de prolifération ou de différenciation cellulaire... Au niveau de l'organisme, on peut s'intéresser à l'effet sur la survenue de certaines pathologies (malformations congénitales, infertilité...). Définir la toxicité réelle des contaminants chimiques implique également une bonne connaissance de la toxicocinétique. Enfin, certains effets concernent la population dans son ensemble, comme c'est le cas de modifications du sex-ratio.

Un des enjeux de la recherche est l'intégration des connaissances sur les effets d'une substance donnée observés aux différentes échelles (moléculaire, cellulaire, organe, organisme, population). En effet, les connaissances biologiques et physiopathologiques ne permettent que rarement de prédire avec précision les répercussions d'une anomalie observée à une certaine échelle sur les niveaux d'organisation supérieurs.

Bibliographie

EUROPEAN UNION. Proceedings of European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. European Union Report EUR 17459, Weybridge report. 1996, 125pp (http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/reports_en.htm)

KAVLOCK RJ, ANKLEY GT. A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Anal* 1996, **16** : 731-739

14
Toxicocinétique

Du point de vue du toxicologue, le parcours d'un xénobiotique dans l'organisme peut se schématiser selon quatre étapes majeures (figure 14.1). La première correspond à l'absorption, c'est-à-dire le passage du milieu extérieur vers le milieu intérieur. La seconde est la distribution du composé dans les différents compartiments de l'organisme, les compartiments se traduisant par un ou plusieurs sites de stockage, des organes ou des tissus cibles, et des sites de biotransformation de la substance absorbée (3e étape). Enfin, l'étape d'élimination consiste à rejeter dans le milieu extérieur le xénobiotique préalablement absorbé.

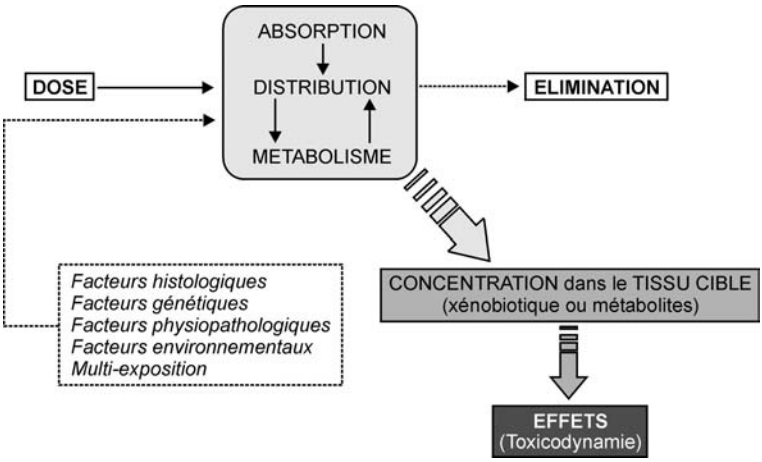


Figure 14.1 : Principales étapes pharmacocinétiques

Certes, ce schéma est simplifié et de nombreux xénobiotiques peuvent être stockés dans différents tissus ou subir des modifications chimiques dans plusieurs organes, mais il reflète la réalité de deux processus que l'on a coutume de distinguer mais qui sont intimement liés : la toxicocinétique et la toxicodynamie. La toxicocinétique couvre les phénomènes d'absorption, de distribution tissulaire, de métabolisme et d'excrétion, c'est-à-dire qu'elle a pour principal objectif de déterminer la quantité de substance toxique susceptible d'atteindre sa cible et de préciser sous quelle forme (composé initial ou métabolites) elle y parvient. La toxicodynamie se préoccupe de l'interaction

du xénobiotique avec sa cible et de l'effet toxique que cela produit. Les interactions entre ces deux domaines déterminent la toxicité d'une substance. De façon générale, plus la forme toxique d'un xénobiotique est capable d'atteindre la cible et plus cette dernière est sensible à l'agent exogène et plus l'effet toxique sera important.

Dans la mesure où la toxicocinétique est un élément critique de la caractérisation du danger d'une substance chimique, il convient de la prendre en compte dans toute évaluation du risque. Dans ce chapitre, nous traiterons des différentes phases prises en compte dans les approches de toxicocinétique telles qu'elles sont définies dans la ligne directrice 417 de l'OCDE qui vient d'être adoptée (OECD, 2010). Comme il est souligné dans ce document, les données toxicocinétiques peuvent aider à évaluer l'adéquation et la pertinence des données de toxicité animale, à des fins d'extrapolation des dangers pour l'homme, et peuvent apporter des informations utiles pour déterminer les effets liés à la voie d'administration, la biodisponibilité et autres aspects relatifs à la conception de l'étude. En outre, les données sur le métabolisme peuvent fournir des informations utiles pour évaluer l'importance de la prise en compte sur le plan toxicologique, de l'exposition à des métabolites exogènes du xénobiotique. Des données toxicocinétiques adéquates aideront à confirmer l'acceptabilité et l'applicabilité des méthodes fondées sur les relations quantitatives structure-activité et les prévisions établies à partir de données croisées sur des substances analogues. Les données toxicocinétiques peuvent également servir à évaluer la pertinence toxicologique d'autres études et par exemple aider à l'extrapolation *in vivo/in vitro*.

Les exemples chargés d'illustrer les différentes parties seront principalement issus de données relatives aux substances perturbatrices endocriniennes reprotoxiques.

Absorption

L'absorption est le processus par lequel une substance pénètre dans l'organisme. Deux éléments de ce processus sont importants à prendre en compte : la quantité absorbée et la vitesse d'absorption. Bien qu'il existe des différences liées à la barrière à franchir (peau, poumon, paroi intestinale), l'absorption des petites molécules revient pour la plupart d'entre elles à un mécanisme de franchissement passif d'une ou plusieurs membranes (Lehman-McKeeman, 2008). Ce phénomène dépend donc en premier lieu des propriétés physicochimiques de la substance elle-même, c'est-à-dire sa masse moléculaire, son degré d'ionisation, sa réactivité, sa solubilité. Les agents chimiques lipophiles sont mieux à même de traverser une membrane dont les constituants sont pour l'essentiel des lipides. En revanche, les molécules ionisées ont très peu de chances de franchir cet obstacle sous cette forme, sauf pour les très petites

molécules qui peuvent dans certains cas diffuser au niveau des pores membranaires. Il existe généralement une bonne corrélation entre le caractère lipophile d'un xénobiotique et son degré d'absorption. Toutefois, en particulier au niveau de l'intestin, cette relation n'augmente plus, ou même décroît pour les substances très lipophiles (log Kow[13] > 4), en raison de la difficulté à former une solution ou une émulsion dans la lumière intestinale (Walsh et coll., 1997). Ainsi, l'absorption digestive chez le rat du BDE 153, un hexabromodiphényléther qui a un log Kow = 6,4 (ATSDR 2004), est d'environ 75 % de la dose (Sanders et coll., 2006 ; Hakk et coll., 2009), alors que pour une dose équivalente et un log Kow = 8,6 (ATSDR 2004), le décabromodiphényléther (BDE 209) n'est absorbé qu'à environ 25 % (Riu et coll., 2008). La relation entre la dose externe et interne dépend donc en grande partie du niveau d'absorption, qui peut être lui-même affecté par le caractère lipophile de la substance ou encore, pour certains composés, de l'efficacité des systèmes de pompe à efflux tels que les P-glycoprotéines.

Il faut signaler que biodisponibilité et absorption ne sont pas synonymes. La différence, par exemple, entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme de la paroi intestinale, à l'efflux vers la lumière intestinale ou encore au métabolisme présystémique dans le foie (OECD, 2010).

Distribution

La distribution tissulaire est le processus selon lequel une substance absorbée (ou ses métabolites) se répartissent dans les différents organes et tissus. Bien que certaines barrières membranaires soient moins perméables que d'autres, les mécanismes de diffusion obéissent, de façon générale aux mêmes règles que celles qui régissent l'absorption et dépendent en premier lieu des caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique. Cependant, en matière de perturbation endocrinienne, le franchissement de certaines barrières telles que la barrière placentaire est à examiner avec attention car il peut conduire à une exposition du fœtus pendant une période particulièrement sensible du développement. Si l'exposition du fœtus aux œstrogènes maternels est limitée en raison de leur liaison à l'α fœtoprotéine, nombre de perturbateurs endocriniens sont beaucoup moins affins à cette protéine et se retrouvent de ce fait facilement dans la circulation fœtale. C'est ce que rapportent Ikezuki et coll. (2002) et Vandenberg et coll. (2007) à propos du bisphénol A.

13. Coefficient de partage octanol/eau, mesure de l'hydrophobicité de la molécule

Métabolisme et élimination

Si les mécanismes d'absorption et de transfert dans les tissus favorisent le passage des molécules non ionisées lipophiles, l'élimination de ces dernières implique au contraire qu'elles soient hydrosolubles afin de pouvoir être excrétées dans l'urine ou dans la bile. Dans la plupart des cas, cela nécessite la transformation chimique du xénobiotique qui a pénétré dans l'organisme et ces réactions sont essentiellement catalysées par des enzymes qui fonctionnent avec des co-facteurs endogènes. Conceptuellement, ce processus a été séparé en deux phases au cours desquelles le xénobiotique est oxydé, réduit ou hydrolysé (phase I) et/ou conjugué à l'acide glucuronique, à un groupement sulfate ou acétate, au glutathion ou encore à un acide aminé (phase II). Ces réactions prennent en charge non seulement les xénobiotiques, mais également les composés endogènes comme les stéroïdes, les prostaglandines ou encore certaines vitamines (figure 14.2).

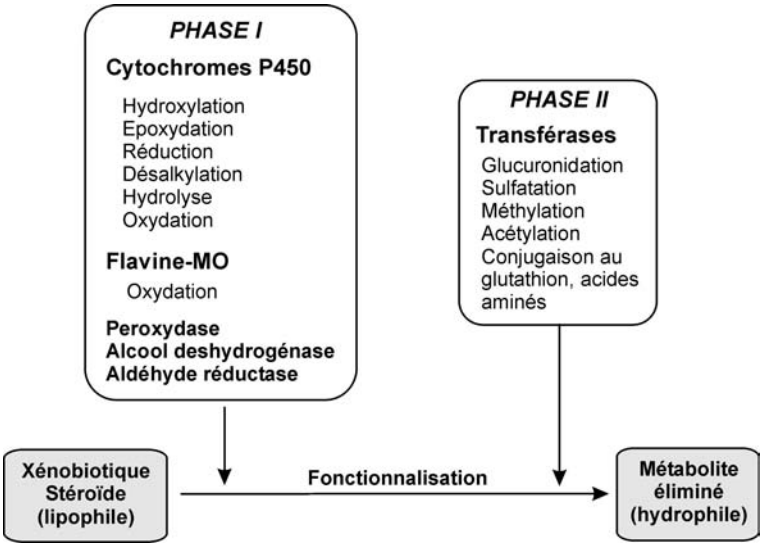


Figure 14.2 : Systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques

Les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques. Ce sont des enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique. On dénombre une soixantaine de CYP différents chez l'homme et une douzaine d'entre eux sont utilisés dans le métabolisme des xénobiotiques, parmi lesquels les formes 1A1/2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4 sont les plus fréquemment impliquées (Guengerich, 2008). Ces différentes formes peuvent être inhibées, activées ou induites par les xénobiotiques, ce qui affecte non seulement le temps de séjour de la substance dans l'organisme, mais peut également se traduire par une modification des taux de

Erratum : CYP2C19 → CYP19A1

synthèse ou de dégradation de certaines hormones lorsqu'elles sont prises en charge par ces enzymes. C'est ainsi que l'on explique, par exemple, l'effet féminisant de l'atrazine, herbicide longtemps utilisé dans la culture du maïs. Ce pesticide est un inducteur du ~~CYP2C19~~ (aromatase), favorisant une surproduction d'œstrogènes et des effets féminisants (Holloway et coll., 2008). Il existe un polymorphisme génétique important pour plusieurs CYP, en particulier les formes 2C9, 2C19 et 2D6, conduisant à des niveaux d'expression enzymatiques très différents selon les individus (Genguerich, 2008). Ce polymorphisme se traduit par des différences interindividuelles de susceptibilité à l'action des toxiques (Hatagima, 2002).

Les réactions de phase II les plus fréquemment utilisées par l'organisme sont la glucuronidation et la conjugaison au glutathion et au groupement sulfate. Alors que la conjugaison à l'acide glucuronique et au sulfate intervient sur des substrats nucléophiles, celle faisant intervenir le glutathion concerne les molécules électrophiles. L'uridine-diphosphate glucuronosyl transférase (UGT) est une famille d'enzymes capable de catalyser le transfert d'un acide glucuronique sur une molécule possédant une fonction alcool, amine ou thiol. Il existe près d'une vingtaine d'UGT différentes chez l'homme (Shipkova et Wieland, 2005), localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique. La plupart des substrats pris en charge par les UGT peuvent également être métabolisés par les sulfotransférases qui, pour celles impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, sont des enzymes cytosoliques qui utilisent le phospho-adénosine-phosphosulfate comme co-facteur. Chez les vertébrés, les UGT, comme les sulfotransférases sont impliquées dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. Les glutathion-transférases sont des enzymes homo- ou hétéro-dimériques qui sont principalement cytosoliques mais qui peuvent, pour certaines classes, être membranaires. Les conjugués au glutathion peuvent être éliminés sous cette forme dans la bile, ou subir d'autres étapes de biotransformation conduisant à la formation d'un conjugué à la cystéine, lui-même pris en charge par les acétyltransférases pour former un conjugué mercapturique finalement éliminé dans l'urine.

Les enzymes de phase II peuvent être induites ou inhibées par des xénobiotiques, mais dans une moindre mesure que les cytochromes P450. L'effet des xénobiotiques sur ces enzymes est un des mécanismes impliqués dans la perturbation endocrinienne. Il a ainsi été montré que les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE) ou les dérivés halogénés du bisphénol A, qui sont trois familles de perturbateurs endocriniens ayant des propriétés œstrogéniques, ont une affinité limitée pour ER (récepteurs aux œstrogènes), mais qu'en revanche, ils (ou leurs métabolites) ont une puissante capacité à inhiber la sulfotransférase 1E1, enzyme chargée d'inactiver l'œstradiol (Kester et coll., 2002). La même observation a été faite pour les alkylphénols et les phtalates (Waring et coll., 2008). Les récepteurs AhR, CAR et PXR jouent un rôle prépondérant dans l'induction des enzymes de phase I et II. AhR, qui est activé par les dioxines et les hydrocarbures aromatiques polyhalogénés

ou non, est surtout impliqué dans l'induction des CYP1A et 1B ainsi que des UGT1A1, 1A3, 1A4 et 1A6 et de la sulfotransférase 1A1 (Jana et Paliwal, 2007 ; Tolson et Wang, 2010). L'activation des récepteurs CAR et PXR provoque l'induction des CYP 2A, 2B, 2C, 3A, de l'UGT1A1, de la sulfotransférase 2A1 et de la GST α1. CYP1A est également régulé par CAR, alors que PXR induit spécifiquement CYP7A (Tolson et Wang, 2010).

Même si un grand nombre de tissus peuvent exprimer des enzymes de biotransformation, c'est le foie qui est l'organe principal du métabolisme. Il est toutefois possible que certaines isoformes particulières soient spécifiquement exprimées dans un tissu extra-hépatique. C'est par exemple le cas de l'aromatase qui chez l'adulte est exprimée dans les ovaires, le placenta, le tissu adipeux, l'os ou dans une moindre mesure, le testicule, mais pas dans le foie, alors que les niveaux d'expression sont très élevés dans le foie fœtal (Simpson et coll., 2002).

Métabolites et effets toxiques

Si ces réactions de phase I et II jouent un rôle essentiel dans l'inactivation des composés exogènes, elles sont également à l'origine des effets toxiques de plusieurs substances (Dekant, 2009). En effet, le processus de biotransformation peut donner lieu à des métabolites réactifs capables de se lier de façon irréversible à des macromolécules endogènes telles que l'ADN ou les protéines et entraîner des effets génotoxiques ou immunotoxiques (figure 14.3).

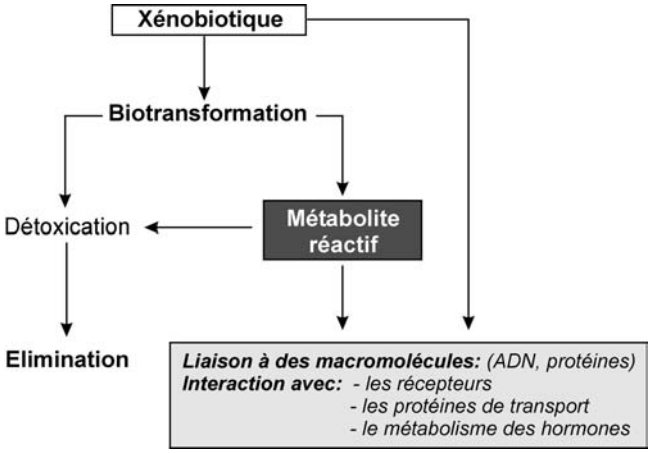


Figure 14.3 : Voies de bioactivation/détoxication des xénobiotiques

La toxicité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le benzo(a)-pyrène ou le diméthylbenzanthracène qui sont métabolisés dans un premier

temps par les P450 relève de ce phénomène et conduit aux effets cancérigènes de ces polluants. Pour ce qui concerne les mécanismes de perturbation endocrinienne, les voies de bioactivation ne passent pas nécessairement par la formation d'un intermédiaire réactif capable de se lier de façon covalente à une molécule endogène, mais le plus souvent par la production d'un métabolite ayant une affinité ou une activité bien plus forte que la substance initiale vis-à-vis d'une protéine de transport ou d'un récepteur nucléaire. Kitamura et coll. (2008) ont ainsi identifié une trentaine de substances qualifiées de pro-œstrogènes parmi les composés naturels ou les contaminants. Ces substances, inactives dans leur état initial, nécessitent l'intervention d'une enzyme, généralement un P450, pour devenir œstrogéniques. Parmi les exemples cités figurent des pesticides (biphényle, DDT, métoxychlore, bifénox), des produits industriels (benzophénone, phtalates, PCB, PBDE, oligomères du styrène, diphényle méthane et diphényle propane), des polluants (B(a)P, 2-nitrofluorène), des phyto-œstrogènes (chalcone).

Une fois formés, les métabolites sont excrétés dans l'urine par le rein ou éliminés dans les fèces via la bile. L'excrétion dans le lait maternel peut également intervenir de façon substantielle, comme cela a été montré pour les PBDE, les phtalates ou le bisphénol A. Généralement, les rongeurs excrètent davantage de métabolites par voie biliaire que le chien, le singe ou l'homme. Cela est dû à des différences entre espèces dans le seuil d'excrétion biliaire des métabolites. Ce seuil, qui dépend de la masse moléculaire du métabolite est d'environ 250 Da chez le rat, alors qu'il est de 400-600 Da pour le chien et l'homme (Dybing et coll., 2002). Après avoir été éliminés dans la bile, les conjugués glucuronides et sulfates peuvent facilement être hydrolysés dans le tube digestif. Les produits de biotransformation ainsi libérés sont ensuite réabsorbés par l'intestin et de nouveau métabolisés au niveau du foie. On parle alors de cycle entéro-hépatique, dont la conséquence première est une augmentation du temps de séjour du xénobiotique dans l'organisme.

Des modèles plus complexes

Le terme « toxicocinétique » prend en compte la répartition du xénobiotique dans les différents compartiments de l'organisme au cours du temps. Le passage de la circulation générale vers les organes se fait généralement par diffusion passive et de ce fait la concentration du composé dans la circulation générale reflète la concentration dans le tissu cible. La relation entre dose externe et dose interne ne peut être obtenue à partir d'études traditionnelles qui mesurent l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du composé et de ses métabolites dans l'urine et les fèces. Elle repose sur la connaissance de l'évolution au cours du temps des concentrations plasmatiques et urinaires des substances que l'on souhaite étudier. À partir des

concentrations mesurées, ces analyses permettent, par des modèles compartimentaux, de déterminer plusieurs variables telles que la clairance, la biodisponibilité, la demi-vie et d'extrapoler des données provenant d'une dose unique à une situation d'exposition chronique (Dybing et coll., 2002). Une telle approche ne permet cependant pas d'appréhender les cinétiques locales (tissulaires) ni d'effectuer des extrapolations interspécifiques car les modèles compartimentaux sont définis à partir des données plasmatiques et non à partir de considérations anatomiques, physiologiques ou métaboliques. Pour répondre au besoin d'extrapolation des modèles animaux à l'homme ou de l'*in vitro* à l'*in vivo*, ou encore pour connaître plus précisément l'exposition fœtale, des modèles plus complexes ont été élaborés, les modèles physiologiques ou PBPK (pour *physiologically-based pharmacokinetic models*). Ces modèles intègrent des données multiples parmi lesquelles les sites de distribution tissulaire, les enzymes impliquées dans le métabolisme, les cinétiques enzymatiques déterminées *in vitro*, les débits sanguins dans les principaux organes, les coefficients de partage tissu-sang, les constantes de liaison... (Leung, 1991, Clewell et Andersen, 1994).

Bibliographie

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Polybrominated Diphenyl Ethers and Polybrominated Biphenyls. 2004 www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp68.html.

CLEWELL HJ, ANDERSEN ME. Physiologically-based pharmacokinetic modeling and bioactivation of xenobiotics. *Toxicol Ind Health* 1994, **10** : 1-24

DEKANT W. The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. *EXS* 2009, **99** : 57-86

DYBING E, DOE J, GROTEN J, KLEINER J, O'BRIEN J, et coll. Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food Chem Tox* 2002, **40** : 237-282

GUENGERICH FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008, **21** : 70-83

HAKK H, HUWE JK, LARSEN GL. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 2009, **39** : 46-56

HATAGIMA A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptorsin cancer susceptibility. *Cad Saúde Pública* 2002, **18** : 357-377

HOLLOWAY AC, ANGER DA, CRANKSHAW DJ, WU M, FOSTER WG. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. *J Appl Toxicol* 2008, **28** : 260-270

IKEZUKI Y, TSUTSUMI O, TAKAI Y, KAMEI Y, TAKETANI Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002, **17** : 2839-2841

JANA S, PALIWAL J. Molecular mechanisms of cytochrome P450 induction: potential for drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* 2007, **9** : 70-76

KESTER MHA, BULDUK S, VAN TOOR H, TIBBOEL D, MEINL W, et coll. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87** : 1142-1150

KITAMURA S, SUGIHARA K, SANOH S, FUJIMOTO N, OHTA S. Metabolic activation of proestrogens in the environment by cytochrome P450 system. *J Health Sci* 2008, **54** : 343-355

LEHMAN-MCKEEMAN LD. Absorption, distribution and excretion of toxicants. *In*: Casarett and Doull's Toxicology – The basic science of poisons. Ed CD Klaassen. McGraw-Hill, New York, 2008, 131-160

LEUNG HW. Development and utilization of physiologically-based pharmacokinetic models for toxicological applications. *J Toxicol Environ Health* 1991, **32** : 247-267

OECD. OECD guideline for the testing of chemicals. Section 4: health effects. Test No 417: Toxicokinetics 2010 (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-417-toxicokinetics_9789264070882-en)

RIU A, CRAVEDI JP, DEBRAUWER L , GARCIA A, CANLET C, JOUANIN I, ZALKO D. Disposition and metabolic profiling of 14C-decabromodiphenylether in pregnant Wistar rats. *Environ Int* 2008, **34** : 318-329

SANDERS JM, LEBETKIN EH, CHEN LJ, BURKA LT. Disposition of 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether (BDE153) and its interaction with other polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in rodents. *Xenobiotica* 2006, **36** : 824-837

SIMPSON ER, CLYNE C, RUBIN G, BOON WC, ROBERTSON K, BRITT K, SPEED C, JONES M. Aromatase – A brief overview. *Annu Rev Physiol* 2002, **64** : 93-127

SHIPKOVA M, WIELAND E Glucuronidation in therapeutic drug monitoring *Clinica Chimica Acta* 2005, **358** : 2-23

TOLSON AH, WANG H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR, *Adv Drug Deliv Rev* 2010, doi:10.1016/j.addr.2010.08.006

VANDENBERG LN, HAUSER R, MARCUS M, OLEA N, WELSHONS WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007, **24** : 139-177

WALSH CT. Toxicokinetics: oral exposure and absorption of toxicants. *In*: Comprehensive toxicology. BOND J (ed). Vol I General principles. Elsevier Science, New York, 1997: 51-61

WARING RH, AYERS S, GESCHER AJ, GLATT HR, MEINL W, et coll. Phytœstrogens and xenœstrogens: the contribution of diet and environment to endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, **108** : 213-220

15
Effets et mécanismes d'action

Les différents types d'effets des substances susceptibles d'altérer la fonction de reproduction, peuvent être envisagés en allant de l'échelle la plus fondamentale (perturbation endocrinienne, interaction avec les récepteurs nucléaires) à la plus intégrée (effets sur l'organisme).

Les xénobiotiques peuvent activer différentes catégories de récepteurs que l'on peut classer en deux grands types : les récepteurs des xénobiotiques au sens strict (récepteur AhR de la dioxine et des hydrocarbures aromatiques polycycliques, récepteur PXR capable de lier des médicaments et des pesticides, le récepteur CAR) et les récepteurs de composés endogènes comme les récepteurs hormonaux qui sont susceptibles d'être modulés par ces xénobiotiques (ER α et β, AR). Les récepteurs des xénobiotiques comme PXR ou AhR ont pour fonction principale l'adaptation de l'organisme à l'afflux de xénobiotiques puisqu'ils sont responsables de l'induction de systèmes enzymatiques et de leur élimination. En ce qui concerne les récepteurs à des ligands endogènes, leur activation illégitime par des facteurs environnementaux conduit à une perturbation endocrinienne ou métabolique (figure 15.1).

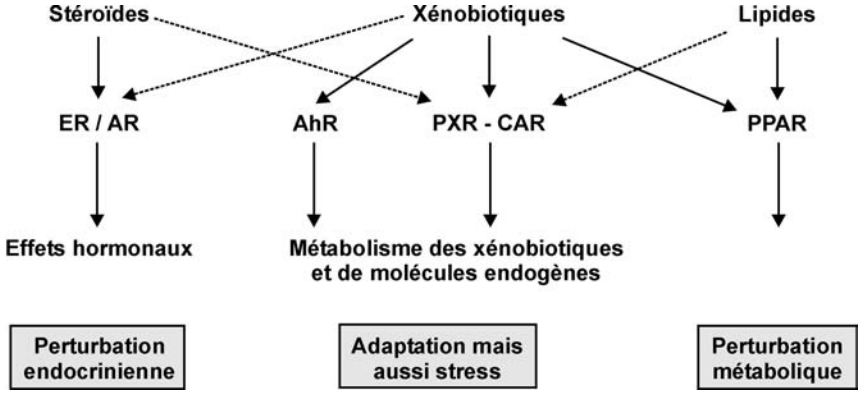


Figure 15.1 : Différents types de récepteurs des xénobiotiques

ER : récepteur aux œstrogènes ; AR : récepteur aux androgènes ; PPAR : récepteur au proliférateur de péroxysome activé ; AhR : récepteur à l'aryl hydrocarbone ; PXR : *pregnan X receptor* ; CAR : *constitutive androstane receptor*

La toxicité d'un xénobiotique peut provenir à la fois de l'interaction avec son récepteur légitime et de l'interaction avec des récepteurs de composés endogènes. Une classification schématique des mécanismes d'action est donc difficile, d'autant que l'affinité de ces substances exogènes aux récepteurs de composés endogènes est à prendre en compte : les substances chimiques présentent des affinités souvent très inférieures à celle de l'hormone naturelle.

La liaison aux récepteurs nucléaires suivie de l'activation (ou l'inhibition) ne constitue pas le seul mécanisme d'action à l'origine d'un effet toxique. Il est de plus en plus évident que des substances peuvent, comme d'ailleurs certains ligands endogènes des récepteurs nucléaires comme le 17β-estradiol, se fixer sur des récepteurs membranaires. De même, il apparaît de plus en plus que certains récepteurs nucléaires peuvent se localiser sous la membrane plasmique ou dans le cytoplasme et y réguler plusieurs paramètres cellulaires sans pour autant agir sur la transcription de gènes cibles. Si la réalité de ces mécanismes « non-génomiques » est à présent bien établie, ils restent cependant à mieux comprendre, notamment leur détournement possible par des molécules toxiques.

Perturbation endocrinienne

Les perturbateurs endocriniens (PE) peuvent agir à plusieurs niveaux : synthèse des hormones, transport, métabolisme, ou encore liaison avec les récepteurs nucléaires constituant les cibles naturelles des hormones. Leur liaison aux récepteurs nucléaires perturbant la liaison des ligands naturels reste toutefois le mécanisme le plus fréquent.

Les PE sont susceptibles de perturber la synthèse des ligands de récepteurs nucléaires. L'aromatase, enzyme clé de la synthèse de l'œstradiol à partir de la testostérone est une cible bien connue de certains PE.

Ils peuvent altérer la liaison aux protéines de transport comme la SHBG (*sex hormone binding globlulin*) ou la transthyrétrine (protéine de transport de la thyroxine). Les PE modifient la clairance des ligands de récepteurs nucléaires en activant des enzymes du métabolisme comme *CYP1A1* (gène cible du récepteur de la dioxine) ou *CYP3A4* et *CYP2B6* (gènes cibles des récepteurs PXR et CAR). Ils peuvent influencer la concentration en récepteurs nucléaires. Les œstrogènes contrôlent l'expression de certains récepteurs nucléaires comme PR (Kastner et coll., 1990) et RAR α (Laganiere et coll., 2005) et la perturbation œstrogénique peut donc par ricochet agir sur d'autres systèmes hormonaux. Les ligands de AhR en activant leur récepteur, lui permettent de devenir nucléaire, de s'associer aux récepteurs ER et AR et d'accélérer leur dégradation par le protéasome (Ohtake et coll., 2007).

Enfin, les PE régulent l'expression de gènes importants pour le développement du tractus reproducteur et participent aux modifications épigénétiques du génome.

Familles des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (codés par 48 gènes distincts chez l'homme) sont regroupés en plusieurs sous-familles qui incluent les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR), à l'acide rétinoïque (RAR), à la vitamine D (VDR), à l'ecdysone (EcR), les récepteurs contrôlant l'activation de la prolifération des péroxysomes (PPAR), ainsi que les récepteurs des xénobiotiques comme PXR ou CAR, les récepteurs aux rétinoïdes (RXR), les récepteurs aux hormones stéroïdiennes telles que les glucocorticoïdes (GR), les androgènes (AR), les minéralocorticoïdes (MR), les progestatifs (PR, pour *Progesterone Receptor*), les œstrogènes (ER), ainsi que les récepteurs orphelins comme ERR (*Estrogen-Related Receptor*), SHP (*Short Heterodimer Partner*) (Escriva et coll., 2000 ; Aranda et coll., 2001). Ces récepteurs nucléaires (RN) sont classés en six groupes selon une nomenclature phylogénique de forme NRXYZ où X représente la sous-famille, Y indique le groupe et Z, le gène (*Nuclear Receptors Nomenclature Committee* 1999, tableau 15.I).

Par exemple, les récepteurs des œstrogènes α et β, qui appartiennent respectivement à la catégorie NR3A1 et NR3A2, sont classés dans la troisième famille des RN, aux côtés des ERR, GR (*Glucocorticoid Receptor*), MR (*Mineralocorticoid Receptor*), PR et AR (*Androgen Receptor*). Les ER forment alors le premier groupe (A) de cette sous-famille et sont codés par deux gènes, désignés respectivement 1 et 2 ce qui correspond aux formes ERα et ERβ. Le groupe B est composé par les ERR et les autres récepteurs nucléaires de cette troisième famille appartiennent au groupe C.

Un grand nombre de récepteurs dont les ligands naturels ne sont pas connus sont appelés récepteurs nucléaires orphelins et ont été identifiés par leur similarité de séquence avec des facteurs existants. Parmi ces récepteurs, nous retrouvons les ERR présents dans la classe III des RN.

Les récepteurs nucléaires sont au cœur de la régulation de nombreux réseaux de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, le développement, l'homéostasie et le métabolisme (Gronemeyer et coll., 2004). Leur dysfonctionnement, mutation ou (in)activation inappropriée, peut conduire à des pathologies de la reproduction ou du métabolisme comme les cancers hormono-dépendants, la stérilité, le diabète ou l'obésité (Swedenborg et coll., 2009). Les récepteurs nucléaires sont des protéines modulaires composées de plusieurs domaines dont un domaine de liaison au ligand qui joue un rôle important dans leur activation. De nombreux perturbateurs endocriniens peuvent se lier à des récepteurs nucléaires et conduire à leur activation ou inactivation.

Tableau 15.I : Récepteurs nucléaires humains (d'après Gronemeyer et coll., 2004)

Nom	Abréviation	Nomenclature	Ligand
Récepteur de l'hormone thyroïdienne	TRα	NR1A1	Hormone thyroïdienne
	TRβ	NR1A2	Hormone thyroïdienne
Récepteur de l'acide rétinoïque	RARα	NR1B1	Acide rétinoïque
	RARβ	NR1B2	Acide rétinoïque
	RARγ	NR1B3	Acide rétinoïque
Récepteur de prolifération des peroxysomes (*Peroxisome proliferator-activated receptor*)	PPARα	NR1C1	Acides gras, leukotriène B4, fibrates
	PPARβ	NR1C2	Acides gras
	PPARγ	NR1C3	Acides gras, prostaglandine J2
Reverse erbA	Rev-erbα	NR1D1	Orphelin
	Rev-erbβ	NR1D1	Orphelin
RAR-related orphan receptor	RORα	NR1F1	Cholestérol, cholestéryl sulfate
	RORβ	NR1F2	Acide rétinoïque
	RORγ	NR1F3	Acide rétinoïque
Récepteur hépatique X	LXRα	NR1H3	Oxystérols, T090 1317, GW3965
	LXRβ	NR1H2	Oxystérols, T090 1317, GW3965
Récepteur Farnesoïde X	FXRα	NR1H4	Acides biliaires, fexaramine
	FXRβ[a]	NR1H5	Lanostérol
Récepteur de la vitamine D	VDR	NR1I1	1,25-dihydroxy vitamine D3, acide litocholique
Récepteur prégnane X	PXR	NR1I2	Xénobiotiques, PCN[b]
Récepteur constitutif de l'androstane	CAR	NR1I3	Xénobiotiques, phénobarbital
Facteur nucléaire humain 4	HNF4α	NR2A1	Orphelin
	HNF4β	NR2A2	Orphelin
Récepteur X de l'acide rétinoïque	RXRα	NR2B1	Acide rétinoïque
	RXRβ	NR2B2	Acide rétinoïque
	RXRγ	NR2B3	Acide rétinoïque
Récepteur testiculaire	TR2	NR2C1	Orphelin
	TR4	NR2C2	Orphelin
Tailless	TLL	NR2E2	Orphelin
Récepteur nucléaire spécifique des cellules photorécepteurs	PNR	NR2E3	Orphelin
Facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet	COUP-TFI	NR2F1	Orphelin
	COUP-TFII	NR2F2	Orphelin

Nom	Abréviation	Nomenclature	Ligand
ErbA2-related gene-2	EAR2	NR2F6	Orphelin
Récepteur des œstrogènes	ERα	NR3A1	17β-Œstradiol, Tamoxifène, Raloxifène
	ERβ	NR3A2	17β-Œstradiol, plusieurs composés synthétiques
Récepteur « *like* » des œstrogènes	ERRα	NR3B1	Orphelin
	ERRβ	NR3B2	DES[c] 4-OH tamoxifène
	ERRγ	NR3B3	DES, 4-OH tamoxifène
Récepteur des glucocorticoïdes	GR	NR3C1	Cortisol, dexaméthasone, RU486
Récepteur des minéralocorticoïdes	MR	NR3C2	Aldostérone, spironolactone
Récepteur de la progestérone	PR	NR3C3	Progestérone, acétate de médroxyprogestérone, RU486
Récepteur des androgènes	AR	NR3C4	Testostérone, flutamide
Facteur B induit par le NGF[d]	NGFIB	NR4A1	Orphelin
Nur related factor 1	NURR1	NR4A2	Orphelin
Neuron-derived orphan receptor 1	NOR1	NR4A3	Orphelin
Facteur stéroïdogénique 1	SF1	NR5A1	Orphelin
Liver receptor homologous protein 1	LRH1	NR5A2	Orphelin
Récepteur des cellules germinales	GCNF	NR6A1	Orphelin
DSS-AHC[e] *critical region on the chromosome, gene 1*	DAX1	NR0B1	Orphelin
Short heterodimeric partner	SHP	NR0B2	Orphelin

[a] XRβ est un pseudogène et ne code pas de récepteur fonctionnel ; [b] PCN : pregnenolone 16α-carbonitrile ; [c] DES : diéthylstilbestrol ; [d] NGF : *nerve growth factor* ; [e] DSS-AHC : *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita*

Mécanisme général d'action des récepteurs nucléaires

Comme leur nom l'indique, la plupart des récepteurs nucléaires sont présents dans le noyau cellulaire où ils régulent la transcription des gènes. Il existe certaines exceptions comme le récepteur des glucocorticoïdes ou celui des androgènes qui sont localisés dans le cytoplasme en absence de ligand, la liaison à celui-ci induisant la translocation du récepteur au noyau. En outre, des études récentes suggèrent que certains récepteurs même en présence de leur ligand peuvent agir dans le cytoplasme d'une façon non génomique en interagissant avec des cibles dont l'identité reste encore peu claire.

De nombreuses données fonctionnelles indiquent qu'en absence de leur ligand la plupart des récepteurs nucléaires sont fixés à l'ADN, reconnaissent des corépresseurs transcriptionnels et bloquent la transcription. C'est le cas par exemple de PPAR qui forme un hétérodimère avec RXR et qui réprime la

transcription en absence de ligand. Cependant, plusieurs analyses pangénomiques récentes fondées sur la méthode d'immunoprécipitation de chromatine couplée à du séquençage massif remettent quelque peu en cause la généralité de ce mécanisme et suggèrent que cela ne se produit pas pour tous les gènes cibles. Par ailleurs, il faut noter que ce mécanisme ne s'applique pas aux récepteurs stéroïdiens comme ER, AR ou GR qui ne semblent pas présents dans le noyau en absence de ligand.

Il est clairement établi que le ligand induit un changement de conformation du domaine de fixation du ligand (LBD) via la modification de la surface du récepteur, à l'origine du départ du corépresseur et du recrutement du coactivateur. C'est le cas des récepteurs qui hétérodimérisent avec RXR comme les récepteurs des rétinoïdes (RAR α, β et γ), de la vitamine D (VDR), des xénobiotiques (PXR, CAR), des TR et des PPAR. Ces récepteurs ont des activités basales qui varient selon leur affinité pour les corépresseurs. Ainsi les TR sont de meilleurs répresseurs que PXR ou CAR. De même, PPARβ est plus répresseur que PPARγ (Shi et coll., 2002).

Concept de *Selective Nuclear Receptor Modulators* (SnuRM)

L'étude détaillée de la pharmacologie des récepteurs nucléaires a permis de mieux comprendre les bases structurales et fonctionnelles de leur régulation par des ligands agonistes ou antagonistes. Ceci a été rendu possible par l'intérêt clinique que pourraient présenter des molécules capables d'activer un récepteur donné seulement dans certains organes de façon à avoir une action dénuée le plus possible d'effets secondaires. Ce concept est bien illustré par le cas des récepteurs des œstrogènes qui ont été sans doute les plus étudiés de ce point de vue mais on sait à présent qu'il est généralisable à l'ensemble des récepteurs nucléaires (Gronemeyer et coll., 2004 ; Germain et coll., 2006). Ainsi il serait important de pouvoir développer des molécules capables d'activer le récepteur ERα dans l'os (pour traiter les conséquences de l'ostéoporose suite à la chute du taux d'œstrogènes qui se produit chez la femme lors de la ménopause) tout en l'inactivant dans l'ovaire, l'utérus ou le sein pour éviter les risques de cancers associés à la stimulation œstrogénique. Une telle molécule, le raloxifène a été mise au point et son mode de fonctionnement tissu-spécifique repose sur deux principes importants du fonctionnement des récepteurs nucléaires. Selon le premier principe, différents ligands en se fixant dans la poche hydrophobe du domaine de fixation du ligand (LBD) induisent un changement de conformation subtilement différent. Ce changement de conformation aboutit à la rélocalisation d'une hélice α C-terminale du LBD, l'hélice 12 qui va former une surface du récepteur disponible pour l'interaction avec des coactivateurs transcriptionnels. Il a été montré que les positions de l'hélice 12 dans des LBD de ERα fixant le 17β-œstradiol, un antagoniste comme le tamoxifene ou la génisteine sont effectivement différentes.

Selon le deuxième principe, il existe de nombreux coactivateurs transcriptionels des récepteurs nucléaires, chacun d'entre eux ayant une sensibilité différente à des changements de la surface du récepteur induits par des ligands différents (Shang et Brown, 2002). Ces coactivateurs ayant des distributions tissulaires différentes, on arrive ainsi à comprendre comment un ligand donné peut activer un récepteur dans un tissu A donné mais pas dans un autre tissu B. Dans A, le récepteur lié au ligand aura une conformation reconnue par un coactivateur présent dans ce tissu alors que dans le tissu B ce coactivateur ne sera pas présent et donc le récepteur sera inactif. Ceci débouche sur le concept de SERM (*selective estrogen receptor modulator*) : des ligands modulateurs du récepteur des œstrogènes qui peuvent être sélectifs d'un tissu donné.

Ce concept est bien établi et il a pu être appliqué à de nombreux autres récepteurs (AR, PPAR, TR...) au point d'être à présent généralisé à l'ensemble de la superfamille. On parle donc de SnuRM : *Selective Nuclear Receptor Modulators*. Cependant, la transcription est un processus très dynamique et ceci n'est pas pris en compte dans le modèle décrit. Ce concept reste néanmoins fondamentalement important pour l'étude des molécules toxiques et en particulier des perturbateurs endocriniens. En effet, ces molécules semblent pouvoir être considérées comme des SNuRM ou SERM. Chacune d'entre elles peut induire une conformation légèrement différente du récepteur qu'elle va pouvoir fixer et entraîner un panel d'effets dans différents organes spécifiques de chaque molécule. Ceci est d'autant plus vrai que, la plupart des perturbateurs endocriniens n'ont pas une cible unique mais sont capables de reconnaître plusieurs récepteurs avec des affinités différentes. La gamme des effets générés par des molécules différentes est donc très vaste et cela explique pourquoi il est très compliqué de pouvoir faire un lien entre les mécanismes d'action d'une molécule *in vitro* et ses effets *in vivo*. Ce n'est pas parce que deux molécules vont *in vitro* être capables de se fixer au même récepteur avec des affinités comparables qu'elles vont avoir *in vivo* une gamme d'effets identiques, même si leur toxicocinétique, et leur métabolisme sont très proches.

Récepteurs ER

Les récepteurs des œstrogènes (ERα et β, NR3A1 et NR3A2) sont les récepteurs de l'hormone sexuelle féminine, l'œstradiol qui joue un rôle très important dans une grande variété de tissus comme la glande mammaire, l'utérus, la moelle osseuse, l'os et le système cardiovasculaire. ERα est surtout exprimé dans l'utérus, le foie, les reins et le cœur alors que ERβ est plutôt exprimé dans l'ovaire, la prostate, les poumons, le tractus intestinal et les systèmes hématopoïétique et nerveux central (Kuiper et coll., 1997). Ils sont également co-exprimés dans un certain nombre de tissus comme la glande mammaire, la thyroïde, la moelle osseuse et certaines régions du cerveau. Quoique ayant des mécanismes similaires d'action, des différences existent dans leur pharmacologie et dans leur capacité à activer les gènes cibles ce qui suggère que ces

récepteurs ont des rôles différents comme l'a démontré l'étude des souris dans lesquelles les gènes codant pour chacun de ces récepteurs ont été inactivés (Couse et coll., 1997). Ainsi quand les deux récepteurs sont co-exprimés, ERβ possède une action inhibitrice sur la capacité de ERα à activer ses gènes cibles. De même, ERβ a été montré comme capable de bloquer l'effet activateur de ERα sur la prolifération dans le sein, l'utérus ou la prostate (Pettersson et coll., 2000).

La grande majorité des ligands environnementaux de ces récepteurs sont des molécules agonistes et ont une meilleure affinité pour ERα (figure 15.2). Cependant, certaines molécules ont une meilleure affinité pour ERβ. C'est le cas de phyto-œstrogènes comme la génistéine (chez les mammifères), la biochanine A ou la daidzéine, de benzophénones comme la benzophénone 1 ou 2, de biphénol comme le 44' biphénol. Enfin, certaines molécules ont une activité agoniste sur ERα et antagoniste sur ERβ. C'est le cas de pesticides comme le méthoxychlore ou le chlordécone (Le Maire et coll., 2010). Ceci illustre bien le fait que de nombreuses molécules toxiques se comportent comme des SERM et peuvent avoir des effets tissus-spécifiques marqués ce qui rend la comparaison *in vitro in vivo* très complexe.

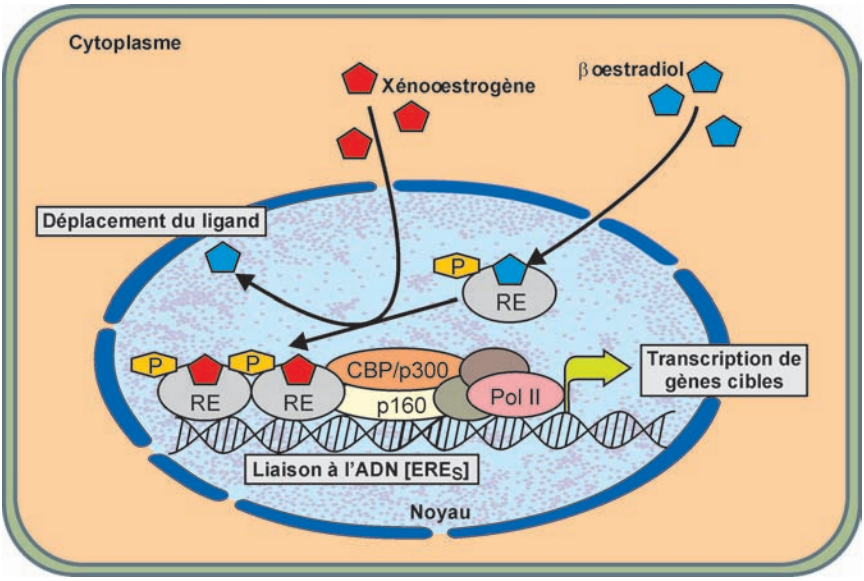


Figure 15.2 : Activation illégitime du récepteur des œstrogènes (d'après Massaad et Barouki, 1999)

RE : récepteur des œstrogènes ; ERE : *estrogen response element*

Récepteurs AR

Le récepteur des androgènes (AR, NR3C4) est le récepteur des hormones sexuelles mâles, la testostérone et son métabolite, la dihydrotestostérone. L'AR est principalement exprimé dans le testicule, il est présent dans la prostate, les glandes surrénales, les reins, le cerveau et l'hypophyse. Le rôle du récepteur AR dans les organes mâles est très similaire à celui des récepteurs ER dans les organes femelles. Les androgènes humains comme la testostérone ou la dihydrotestostérone sont des agonistes. Chez les poissons, le système de réponse aux androgènes est plus complexe : il existe un second ligand en plus de la dihydrotestostérone, la 11-ketotestostérone (11KT) et la plupart des espèces présentent deux récepteurs des androgènes AR-A et AR-B dont les pharmacologies semblent être distinctes (Douard et coll., 2008). La grande majorité des ligands environnementaux de ce récepteur sont des molécules antagonistes (Paris et coll., 2002 ; Korner et coll., 2004). Très peu d'androgènes environnementaux sont des agonistes excepté le retardateur de flamme bromé TBECH (Khalaf et coll., 2009).

Récepteurs PPAR

La famille des récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des péroxysomes (PPAR) comprend trois membres distincts, désignés α, β et γ (NR1C1, NR1C2, NR1C3). Ils sont activés par la liaison de certains acides gras et/ou de leurs métabolites lipidiques (Forman et coll., 1997 ; Kliewer et coll., 1997). Les PPAR pourraient ainsi jouer un rôle déterminant en signalant, au niveau de l'expression génique, un changement de l'apport nutritionnel et, en particulier, de sa composition lipidique. Les PPAR forment des hétérodimères avec les récepteurs RXR (Gronemeyer et coll., 2004) et se fixent sur des éléments de réponse qui sont des répétitions directes du motif hexamérique de reconnaissance des récepteurs nucléaires espacés par un nucléotide.

Les PPAR présentent une expression tissulaire spécifique. Chez l'homme, PPARα est la forme majoritaire dans le foie et est exprimé à un niveau relativement faible dans les autres tissus (Auboeuf et coll., 1997). PPARβ est exprimé de façon très ubiquitaire avec, peut-être, une expression plus importante dans le côlon et dans la peau. Le même type de résultat a été retrouvé chez le rat adulte, chez qui PPARγ est exprimé principalement dans le tissu adipeux et le tractus gastro-intestinal, en particulier dans le côlon, alors qu'il est très faiblement représenté dans le foie ou le muscle squelettique (Auboeuf et coll., 1997).

Les ligands environnementaux de PPARγ sont essentiellement agonistes. Ce sont certains phtalates (MEHP, BBP, DBP), les PFOS et PFOA et des dérivés halogénés du bisphénol A (Casal-Casas et coll., 2008 ; Balaguer, communication personnelle). Les organoétains activent l'hétérodimère RXRα-PPARγ

mais l'activation pourrait se produire essentiellement à travers RXRα (Le Maire et coll., 2009).

Chez les rongeurs, une spécificité des PPAR doit être mentionnée. En effet, ceux-ci sont appelés PPAR pour *Peroxysome Proliferators Activated Receptors* parce que, lors de leur découverte, on a pu montrer qu'ils étaient activés par des hépatocarcinogènes comme la nafénopine (Issemann et Green, 1990), qui sont connus pour promouvoir une prolifération des peroxysomes liée à leur activité carcinogénique. Depuis, il a été démontré que cette prolifération des peroxysomes ne se produit que chez les rongeurs et n'est pas présente dans d'autres espèces y compris l'homme. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le MEHP a été démontré être un activateur des PPAR dès la découverte de ces derniers (Issemann et Green, 1990).

Récepteurs des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes interviennent dans le développement des vertébrés notamment la métamorphose chez les amphibiens et les poissons et le maintien de l'homéostasie métabolique. Leurs actions sont médiées par les récepteurs nucléaires TRα et TRβ (NR1A1, NR1A2). La différence d'expression tissulaire de ces deux récepteurs suggère qu'ils exercent des fonctions physiologiques non redondantes. TRβ semble principalement impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la sécrétion hypophysaire de TSH (thyrotropine), dans la physiopathologie de la résistance aux hormones thyroïdiennes (RHT), et dans le développement de l'audition.

Au contraire, les souris dont le gène de TRα été invalidé présentent une atrophie thyroïdienne avec diminution des taux de TSH et d'hormones thyroïdiennes. Le phénotype clinique associe un retard de la croissance et de la maturation osseuse et intestinale et l'absence de déficit auditif. Cependant les récepteurs TRα et TRβ sont capables, dans une certaine mesure, de coopérer et/ou de se substituer l'un à l'autre (Flamant et coll., 2007). Certains organes constituent cependant des tissus cibles spécifiques d'un type de récepteur comme l'oreille interne, l'hypophyse, le cœur, le foie, l'os ou l'intestin grêle.

Le bisphénol A et ses dérivés halogénés ont été décrits comme étant des antagonistes des TR (Moriyama et coll., 2002 ; Sun et coll., 2009).

Régulation de l'expression de gènes importants pour le développement du tractus reproducteur

Il existe deux grands exemples bien caractérisés de la régulation de gènes impliqués dans le développement du tractus reproducteur. Tout d'abord, l'analyse du promoteur du gène de l'INSL3 (*Insuline-like* 3) a permis de montrer que celui-ci contenait à la fois des éléments de réponse aux androgènes et aux

œstrogènes ce qui en fait donc une cible de choix pour l'étude des perturbateurs endocriniens chez le mâle (Laguë et Tremblay, 2009). La testostérone stimule l'expression de ce gène et les œstrogènes l'inhibent. Chez la femelle, le gène à homeobox *HOXA10* est critique pour l'organogenèse utérine. L'expression de celui-ci est dépendante de la présence d'un élément de réponse aux œstrogène (ERE) et peut être altérée par ER α (Akbas et coll., 2004 ; Couse et coll., 2004). Le DES est capable d'altérer l'expression de ce gène, conduisant à son expression de manière inappropriée, et d'induire ainsi des malformations du tractus génital femelle. Plus récemment, il a également été proposé que le DES augmente la méthylation de ce gène spécifiquement lors d'une exposition *in utero* (Bromer et coll., 2009).

Bien que beaucoup moins clairement caractérisée, l'altération des enzymes de biosynthèse des stéroïdes a été rapportée en réponse à divers PE. Ainsi par exemple les phtalates inhibent l'expression des enzymes de biosynthèse de la testostérone dans le testicule fœtal de rat tels que Star, Cyp11a et Cyp17a. Dans les cellules de la granulosa, le bisphénol A pourrait altérer l'expression de l'aromatase, enzyme impliquée dans la transformation de la testostérone en œstradiol (Kwintkiewicz et coll., 2010). Cependant, il n'est pas évident que ces mécanismes impliquent des récepteurs nucléaires. L'inhibition directe de l'activité de ces enzymes est également proposée comme un mécanisme d'action pour certains perturbateurs endocriniens.

L'application actuelle des approches de génomique (*microarray* et séquençage haut débit) et de protéomique apparaît comme une possibilité pour prochainement identifier globalement l'ensemble des gènes régulés par un perturbateur endocrinien donné. Cependant, à l'heure actuelle les travaux utilisant ces technologies dégagent essentiellement des « signatures » de perturbateurs sans apporter encore un lien de causalité entre la variation d'expression des gènes identifiés et la survenue de pathologies.

Plusieurs études ont montré que des perturbateurs endocriniens peuvent induire des signatures différentes de celles des ligands endogènes, notamment les œstrogènes. Cela renforce la notion que ces perturbateurs ont une vaste gamme d'effets qu'il faut étudier en tenant compte de leur spécificité d'action et de la multiplicité des cibles possibles. L'idée d'un lien simple entre perturbation endocrinienne, action œstrogénique et reprotoxicité doit être abandonnée, la situation apparaissant bien plus complexe.

Mécanisme épigénétique

L'épigénèse est un mécanisme d'altération du génome sans modification de la séquence d'ADN, basé sur un changement dans la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones de la chromatine. Ces modifications perdurent sur plusieurs générations et peuvent donc provoquer un changement de phénotype sous l'influence de l'environnement. Cependant, il n'est pas toujours

évident de distinguer un réel mécanisme épigénétique d'un effet génotoxique ou d'un dommage oxydatif. Le stress oxydant impliqué dans un grand nombre de mécanismes physiopathologiques, est un effet secondaire fréquent de l'exposition à des polluants, en particulier par l'intermédiaire de l'induction de cytochromes P450. Des polluants peuvent entraîner également l'induction de cytokines et une situation inflammatoire qui peut être liée au stress oxydant.

Effets épigénétiques dans la lignée germinale

Une des spécificités de la lignée germinale est la transmission non seulement du génome mais également d'une mémoire épigénétique à la génération suivante. Il a été montré récemment qu'une exposition transitoire au cours de l'organogenèse gonadique à deux perturbateurs endocriniens, la vinclozoline ou le méthoxychlore, réduit la fertilité et la production de sperme du testicule adulte (Anway et coll., 2005). De manière frappante ce phénotype est transmis à travers la lignée germinale mâle sur au moins quatre générations sans exposition additionnelle. Ce phénotype a été associé à une modification globale de la méthylation du génome dans la lignée germinale mâle. Ce phénomène a ouvert un nouveau champ de recherche au travers des effets épigénétiques induits par les perturbateurs et qui pourraient être transmis de génération en génération. Notons immédiatement deux points. La fenêtre d'exposition proposée correspond à une étape du développement des cellules germinales primordiales au cours de laquelle la méthylation de l'ADN subit de profonds bouleversements, étant déméthylée puis reméthylée de manière sexe-spécifique. Les doses utilisées de substances sont cependant très nettement supérieures à celles pouvant être retrouvées dans l'environnement.

Effets au niveau cellulaire

Au sein des organes composant le tractus reproducteur, de nombreux paramètres cellulaires sont mesurés : apoptose, prolifération, différenciation. La perturbation de ces processus peut être source de troubles de la fertilité ou expliquer la survenue de lésions précancéreuses. Comme indiqué ci-dessus, établir un lien entre l'action *in vitro* des différentes substances, les effets cellulaires observés lors d'une exposition expérimentale et les anomalies physiopathologiques éventuellement observées chez l'homme ou l'animal est extrêmement difficile.

Apoptose ou mort cellulaire programmée

C'est une voie de mort cellulaire en réponse à un signal et qui aboutit à la fragmentation de l'ADN ; elle est physiologique et programmée. L'apoptose

est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Dans le cas du développement des gonades, plusieurs perturbateurs endocriniens sont suspectés d'augmenter l'apoptose au sein de la lignée germinale. L'apoptose des cellules germinales conduit à une diminution du nombre des cellules germinales, un processus qui, s'il n'est pas compensé par la prolifération des cellules survivantes, peut conduire à une diminution du nombre de gamètes et donc à une hypofertilité. Ainsi par exemple des stress génotoxiques tels que les rayonnements ionisants sont connus depuis longtemps pour induire l'apoptose des cellules germinales tant mâles que femelles et peuvent ainsi être cause de stérilité. Plusieurs phtalates ou le DES (diéthylstilbestrol) ont été décrits comme pouvant induire l'apoptose des cellules germinales mâles au cours du développement (Habert et coll., 2009). Récemment, la génisteïne a été montrée capable d'induire de l'apoptose *in vivo* chez le zebrafish traité au cours de la période embryonnaire (Sassi-Mesai et coll., 2009).

L'apoptose est un phénomène physiologiquement impliqué dans le développement des organes et une baisse de l'apoptose peut également avoir des conséquences pathologiques. Les cellules cancéreuses sont fréquemment des cellules dans lesquelles ce mécanisme d'apoptose fonctionne mal et survivent en dépit d'anomalies qui auraient dû conduire à leur élimination. Ainsi, l'apparition ou le développement de lésions « précancéreuses » est souvent attribuée à un défaut dans une voie d'apoptose. Le gène *P53*, un acteur majeur de l'apoptose, est un gène dit suppresseur de tumeur. Dans le cadre des perturbateurs endocriniens, notons par exemple qu'une exposition périnatale au bisphénol A peut diminuer l'apoptose dans la glande mammaire des souris pubères (Munoz de Toro, 2005).

Par ailleurs, l'effet sur l'apoptose peut varier selon l'âge ou le stade de développement. Chez la souris, il a été montré que le MEHP (mono-éthylhexyl phtalate) induit l'apoptose des cellules germinales fœtales mâles à 13,5 jours post-conception mais a très peu d'effet à dose équivalente à 15,5 jours post-conception et est à nouveau capable d'induire l'apoptose des cellules germinales dans des testicules de 18,5 jours post-conception (Lehraiki et coll., 2009). De telles fenêtres d'action extrêmement spécifiques sont couramment décrites pour la gamétogenèse et la stéroïdogenèse fœtale, deux fonctions dont la mise en place est extrêmement dynamique.

Prolifération cellulaire

Un dérèglement de la prolifération cellulaire peut également induire des troubles de la fertilité ou être suspecté dans la survenue de cancers. Notons d'ailleurs que de nombreux gènes contrôlant le cycle cellulaire sont également appelés « suppresseur de tumeurs ».

La diminution de l'activité proliferatrice d'un type cellulaire peut être due à la surexpression d'inhibiteur du cycle cellulaire tel que les protéines p16, p21 ou p27 qui inhibent les complexes Cdk/cyclines requis pour la progression à

travers les différentes phases du cycle cellulaire. À titre d'exemple, les hormones thyroïdiennes inhibent la prolifération des cellules de Sertoli en augmentant l'expression de p27 dans le testicule postnatal et la conséquence de ceci est une diminution du poids testiculaire à l'âge adulte ainsi que de la réserve spermatique (nombre de spermatozoïdes) (Holsberger et coll., 2005 ; Holsberger et Cooke, 2005). Dans le cadre des perturbateurs endocriniens, citons l'exemple des phtalates (DBP) qui sont eux aussi capables de diminuer la prolifération des cellules de Sertoli chez le rat (Auharek et coll., 2010).

Différenciation cellulaire

Dans les tissus, des cellules souches, multipotentes ou progénitrices, se différencient ; la perturbation de ces processus de différenciation peut être cause de troubles de la fertilité ou de cancer.

Dans la lignée germinale, les cellules mitotiques (cellules germinales primordiales, gonocytes, ovogonies ou spermatogonies) expriment de nombreux marqueurs de cellules souches tels que OCT4, un facteur de transcription. Au moment de la différenciation de ces cellules, celles-ci perdent leurs marqueurs de multipotence. Le blocage de la différenciation de cellules germinales fœtales est corrélé à la survenue de tumeurs testiculaires. Ainsi l'invalidation du gène *Dmrt1* chez la souris induit le maintien de l'expression de Oct4, Sox2 et Nanog dans les cellules germinales dans le testicule fœtal et la survenue de tératome dans le testicule des souris adultes (fond génétique SV129, Krentz et coll., 2009). Ainsi, pour les perturbateurs endocriniens, il a été proposé que certains phtalates (DBP) bloquent ou retardent la différenciation des cellules germinales fœtales mâles chez le rat en maintenant l'expression d'OCT4 dans de petits groupes de cellules qui auraient échappé au processus de différenciation (Ferrara et coll., 2006). Cependant, il n'a pas été retrouvé de cancers testiculaires chez les rats exposés aux phtalates peut-être du fait que ce type de cancer est très peu fréquent chez les rongeurs en dehors de certains fonds génétiques très spécifiques.

Dans le cas des tissus stéroïdogéniques, cellules de la granulosa ou cellules de Leydig, la sécrétion d'hormones stéroïdes en réponse à une stimulation par des gonadotropines est couramment utilisée comme un paramètre permettant de juger de l'état de différenciation. Ainsi, la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig en réponse à la LH est un paramètre permettant de mesurer la différenciation des cellules de Leydig (Livera et coll., 2006). Dans le cas des cellules de la granulosa, c'est la sécrétion de progestérone et/ou d'œstradiol qui est mesurée. Par exemple, il a été montré que le bisphénol A diminue la production de progestérone des cellules de la granulosa porcines (Grasselli et coll., 2010).

Interaction avec plusieurs voies de signalisation

Le récent travail de David Volle qui s'est intéressé aux effets du DES (diéthylstilbestrol, un œstrogène synthétique non stéroïdien) dans le testicule postnatal de souris, illustre bien ce phénomène d'interaction avec plusieurs voies de signalisation (Volle et coll., 2009). En effet, cette équipe a montré que les perturbations des fonctions testiculaires induites par l'injection de DES à des souriceaux impliquent à la fois une perturbation de la signalisation stéroïdienne et de la signalisation rétinoïdienne par l'intermédiaire d'un même récepteur (SHP ; NR0B2). Par ailleurs, ces auteurs ont également mis en évidence des effets complexes à la fois dans les cellules de Leydig et les cellules germinales. Ce travail montre la difficulté d'appréhender les effets au sein d'un tissu quand une même substance peut perturber plusieurs voies de signalisation et plusieurs types cellulaires interdépendants. Par exemple, l'implication de SHP dans la gamétogenèse n'a été proposée que très récemment (Volle et coll., 2007).

Effets pathologiques

Les effets moléculaires et cellulaires des PE peuvent avoir pour conséquences des altérations physiologiques entraînant une pathologie au niveau des organes reproducteurs et/ou de la fonction de reproduction.

Effets des anti-androgènes

L'hypospadias et la cryptorchidie peuvent être causées par des anti-androgènes. D'autres paramètres additionnels sont utilisés pour mesurer expérimentalement les effets de substances sur l'action des androgènes au cours du développement des rongeurs mâles. Ceux-ci comprennent la distance anogénitale, le poids du muscle levator ani-bulbocaverneux, la rétention des tétines chez le mâle, le poids et la structure histologique du testicule, de l'épididyme, de la prostate ou des vésicules séminales et la production de spermatozoïdes (Gray et coll., 2001). Le comportement lors de l'accouplement peut être utilisé pour appréhender des effets au niveau du système nerveux central.

Deux grands modes d'action ont été proposés pour les anti-androgènes. Certains ont directement une activité antagoniste au niveau du récepteur et d'autres perturbent la synthèse et/ou le métabolisme des androgènes. Ainsi, par exemple, certains phtalates peuvent inhiber la synthèse d'androgènes des cellules de Leydig fœtales de rat (Parks et coll., 2000 ; Foster et coll., 2001). Cet effet s'accompagne de malformation de l'épididyme, d'hypospadias, de la persistance de tétines (aréoles de structures mammaires) et d'une diminution de la distance anogénitale.

Effets des substances œstrogéniques

Chez le mâle, il semble exister de grande ressemblance entre l'effet des œstrogènes et celui des substances anti-androgéniques peut-être du fait que les œstrogènes peuvent diminuer le taux de récepteur aux androgènes (Williams et coll., 2001 ; Sharpe et coll., 2003). De plus, les œstrogènes peuvent inhiber l'expression de l'INSL3, qui permet la descente testiculaire.

Chez la femelle, la substance œstrogénique qui fut la mieux étudiée est le DES. Celle-ci cause des malformations des organes reproducteurs, essentiellement au niveau du vagin et de l'utérus. Les œstrogènes sont également des acteurs importants du développement de la glande mammaire et des cancers mammaires.

Effets systémiques

Les xéno-œstrogènes pourraient également avoir un effet au niveau systémique conduisant à la perturbation du contrôle hormonal du développement de certains organes comme le testicule. Ces substances peuvent inhiber la sécrétion des hormones hypophysaires par rétrocontrôle sur les récepteurs aux œstrogènes présents au niveau de l'hypothalamus (figure 15.3).

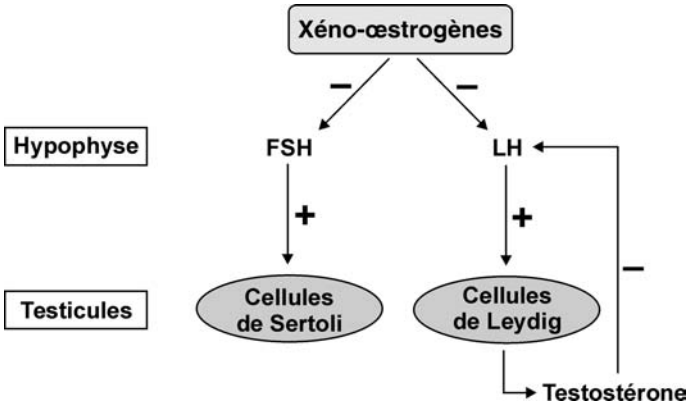


Figure 15.3 : Inhibition de la sécrétion des hormones hypophysaires FSH et LH par les xéno-œstrogènes (d'après Massaad et Barouki, 1999)

L'action de ces xéno-œstrogènes durant la période critique du développement fœtal correspondant à la morphogenèse testiculaire conduit au syndrome de dysgénésie testiculaire. En effet, il est admis que l'oligospermie, le cancer du testicule, la cryptorchidie et l'hypospadias sont des manifestations d'un même syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT). Le SDT résulte de la perturbation hormonale du programme embryonnaire de développement des gonades durant la vie fœtale. Le SDT serait ainsi la conséquence d'une exposition anormale à des facteurs environnementaux (perturbateurs endocriniens) dont

les actions seraient favorisées par un terrain génétique particulier. Il faut cependant noter que le concept de dysgénésie testiculaire est contesté par certains auteurs qui pensent que les quatre manifestations cliniques (oligospermie, cancer du testicule, cryptorchidie et hypospadias) ne sont liées ni sur le plan épidémiologique ni sur celui des causes sous-jacentes (Akre et Richiardi, 2009).

Par l'intermédiaire d'un rétrocontrôle négatif, les xéno-œstrogènes inhibent les sécrétions hypophysaires de FSH et de LH. L'induction de l'aromatase ou l'inhibition des enzymes qui dégradent l'œstradiol peut conduire à des effets cancérogènes. Les xéno-œstrogènes cumulatifs ou non sont également susceptibles de jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la prolifération cellulaire du tissu mammaire.

Impact des polymorphismes génétiques

Divers polymorphismes dans des acteurs clefs de la fonction de reproduction sont connus. Ainsi des polymorphismes dans les gènes codant pour l'INSL3 et son récepteur RXFP2 ont été décrits chez l'être humain mais leur rôle dans la pathogenèse de la cryptorchidie reste débattu (Virtanen et Toppari, 2008). Cependant, ces polymorphismes pourraient modifier l'activité des protéines codées par ces gènes et s'ajouter à l'effet de perturbateurs tels que le DBP qui modifie l'expression de l'INSL3. Des polymorphismes ont également été décrits pour les récepteurs aux androgènes (AR) et aux œstrogènes (ER) ainsi que pour SF1 ou pour certains PPAR. Plus globalement, la notion d'interaction entre gènes et environnement reste très peu explorée dans le cadre de la reprotoxicité. Pourtant pour certains perturbateurs endocriniens (notamment des phtalates) des effets très différents ont été rapportés d'une espèce à l'autre et parfois même entre deux lignées différentes d'une même espèce.

Effets des mélanges complexes

Parmi les études qui ont abordé les effets de mélanges complexes, il est possible de dégager deux grandes notions. La première : des « perturbateurs endocriniens de la même catégorie » ont des effets globalement additifs ou cumulatifs. Ainsi, à une dose donnée, isolés, plusieurs composés peuvent ne pas avoir d'effet mais, réunis, ceux-ci peuvent perturber le développement d'un tissu. Bien que dans une certaine mesure cet effet puisse être prévu par des modèles élaborés prenant en compte les effets des composés isolés en fonction d'une gamme complète de doses, de telles expériences soulèvent la question de l'effet des faibles doses. Une des illustrations les plus probantes qui alimente ce débat est l'effet de substances considérées comme « anti-androgéniques ». Il a été montré que la flutamide, la vinclozoline ou la prycymidone peuvent à doses faibles ne pas modifier la distance anogénitale, un critère de la masculinisation mâle mais que le mélange de ces substances diminue significativement ce paramètre (Hass et coll., 2007). De même, chez

le fœtus de rat, trois phtalates différents qui individuellement n'induisent aucune hypospadias peuvent en combinaison induire des hypospadias chez la moitié des ratons (Howdeshell et coll., 2008). Il est donc important de connaître le mode d'action d'une substance potentiellement reprotoxique pour savoir si les effets de celle-ci risque de s'additionner à ceux d'autres perturbateurs reprotoxiques agissant par le même mode d'action.

La seconde notion qui se dégage concerne les mélanges plus complexes impliquant des perturbateurs endocriniens considérés comme de catégories différentes (avec des mécanismes d'actions différents). Dans ce cas, les effets semblent beaucoup moins prévisibles et sont moins bien compris. Un exemple de ce genre est la récente étude d'Eustache et coll. (2009) qui ont administré un mélange de génistéine, un phyto-œstrogène, et de vinclozoline à des doses « faibles » ou « fortes » à des rats depuis la vie fœtale jusqu'à l'âge adulte. Dans ces conditions, le mélange à doses faibles peut diminuer plus fortement le nombre de spermatozoïdes que le mélange à doses fortes. Par ailleurs, à doses faibles, le gavage avec un seul de ces composés n'altère pas ce paramètre. Notons enfin, que ce type d'exposition artificielle est encore loin de reproduire la complexité de la multitude de substances potentiellement reprotoxiques auxquelles l'être humain peut être exposé. Très peu d'études ont tenté d'aborder la question de l'exposition à un mélange complexe de polluants environnementaux reflétant une situation réelle. Citons dans ce cadre le travail de Fowler et coll. (2008) qui démontre que l'élevage de brebis gestantes sur des pâturages « fertilisés » avec des boues d'épandage altère le développement ovarien. Il semble donc qu'un mélange reflétant une exposition complexe humaine (boues provenant des égouts) puisse altérer la fertilité. Évidemment la détermination de(s) substance(s) active(s) et impliquée(s) est dans ce cas plus compliquée.

Effets à l'échelle des populations

Dans certains cas, des substances peuvent avoir des effets qui ne sont pas pathologiques à l'échelle individuelle mais sont délétères à l'échelle de la population. C'est en particulier le cas d'un effet sur le sex-ratio. À titre d'exemple, un effet possible sur le sex-ratio dans l'espèce humaine de polluants persistants, dont certains sont des perturbateurs endocriniens, tels que le plomb (Simonsen et coll., 2006) ou la dioxine (Mocarelli et coll., 2000) a été rapporté.

Bibliographie

AKBAS GE, SONG J, TAYLORHS. A HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 β-estradiol and diethylstilbestrol (DES). *J Mol Biol* 2004, **340** : 1013-1023

AKRE O, RICHIARDI L. Does a testicular dysgenesis syndrome exist? *Hum Reprod* 2009, **24** : 2053-2060

ANWAY MD, SHOW MD, ZIRKIN BR. Protein C inhibitor expression by adult rat Sertoli cells: effects of testosterone withdrawal and replacement. *J Androl* 2005, **26** : 578-85

ARANDA A, PASCUAL A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001, **81** : 1269-1304

AUBOEUF D, RIEUSSET J, FAJAS L, VALLIER P, FRERING V, et coll. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-α in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997, **46** : 1319-1327

AUHAREK SA, DE FRANCA LR, MCKINNELL C, JOBLING MS, SCOTT HM, SHARPE RM. Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 2010, **151** : 2868-2875

BROMER JG, WU J, ZHOU Y, TAYLORHS. Hypermethylation of homeobox A10 by in utero diethylstilbestrol exposure: an epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology* 2009, **150** : 3376-3382

CASALS-CASAS C, FEIGE JN, DESVERGNE B. Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2008, **32** (suppl 6) : S53-61

COUSE JF, KORACH KS. Estrogen receptor-α mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract.*Toxicology* 2004, **205** : 55-63

COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON JA, KORACH KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor-β (ERβ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-knockout mouse. *Endocrinology* 1997, **138** : 4613-4621

DOUARD V, BRUNET F, BOUSSAU B, AHRENS-FATH I, VLAEMINCK-GUILLEM V, et coll. The fate of the duplicated androgen receptor in fishes: a late neofunctionalization event? *BMC Evol Biol* 2008, **8** : 336

ESCRIVA H, DELAUNAY F, LAUDET V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 2000, **22** : 717-727

EUSTACHE F, MONDON F, CANIVENC-LAVIER MC, LESAFFRE C, FULLA Y, et coll. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1272-1279

FERRARA D, HALLMARK N, SCOTT H, BROWN R, MCKINNELL C, et coll. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006, **147** : 5352-5362

FLAMANT F, GAUTHIER K, SAMARUT J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 2007, **21** : 321-333

FORMAN BM, CHEN J, EVANS RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94** : 4312-4317

FOSTER PM, MYLCHREEST E, GAIDO KW, SAR M. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update* 2001, **7** : 231-235

FOWLER PA, DORÀ NJ, MCFERRAN H, AMEZAGA MR, MILLER DW, et coll. In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep. *Mol Hum Reprod* 2008, **14** : 269-80

GERMAIN P, STAELS B, DACQUET C, SPEDDING M, LAUDET V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006, **58** : 685-704

GRASSELLI F, BARATTA L, BAIONI L, BUSSOLATI S, RAMONI R, et coll. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol* 2010, **39** : 34-39

GRAY LE, OSTBY J, FURR J, WOLF CJ, LAMBRIGHT C, et coll. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update* 2001, **7** : 248-264

GRONEMEYER H, GUSTAFSSON JA, LAUDET V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3** : 950-964

HABERT R, MUCZYNSKI V, LEHRAIKI A, LAMBROT R, LÉCUREUIL C, et coll. Adverse effects of endocrine disruptors on the fœtal testis development: focus on the phthalates. *Folia Histochem Cytobiol* 2009, **47** : S67-S74

HASS U, SCHOLZE M, CHRISTIANSEN S, DALGAARD M, VINGGAARD AM, et coll. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environ Health Perspect* 2007, **115** (suppl 1) : 122-128

HOLSBERGER DR, COOKE PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 2005, **322** : 133-140

HOLSBERGER DR, KIESEWETTER SE, COOKE PS. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor α1. *Biol Reprod* 2005, **73** : 396-403

HOWDESHELL KL, RIDER CV, WILSON VS, GRAY LE JR. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res* 2008, **108** : 168-176

ISSEMANN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990, **347** : 645-650

KASTNER P, KRUST A, TURCOTTE B, STROPP U, TORA L, et coll. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990, **9** : 1603-1614

KHALAF H, LARSSON A, BERG H, MCCRINDLE R, ARSENAULT G, OLSSON PE. Diastereomers of the brominated flame retardant 1,2-dibromo-4-(1,2 dibromoethyl)cyclohexane induce androgen receptor activation in the hepg2 hepatocellular carcinoma cell line and the lncap prostate cancer cell line. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1853-1859

KLIEWER SA, SUNDSETH SS, JONES SA, BROWN PJ, WISELY GB, et coll. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94** : 4318-4323

KÖRNER W, VINGGAARD AM, TÉROUANNE B, MA R, WIELOCH C, et coll. Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 2004, **112** : 695-702

KRENTZ AD, MURPHY MW, KIM S, COOK MS, CAPEL B, et coll. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106** : 22323-22328

KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HÄGGBLAD J, et coll. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. *Endocrinology* 1997, **138** : 863-870

KWINTKIEWICZ J, NISHI Y, YANASE T, GIUDICE LC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 400-406

LAGANIÈRE J, DEBLOIS G, GIGUÈRE V. Functional genomics identifies a mechanism for estrogen activation of the retinoic acid receptor α1 gene in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2005, **19** : 1584-1592

LAGUË E, TREMBLAY JJ. Estradiol represses insulin-like 3 expression and promoter activity in MA-10 Leydig cells. *Toxicology* 2009, **258** : 101-105

LE MAIRE A, GRIMALDI M, ROECKLIN D, DAGNINO S, VIVAT-HANNAH V, et coll. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Rep* 2009, **10** : 367-373

LE MAIRE A, BOURGUET W, BALAGUER P. A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions. *Cell Mol Life Sci* 2010, **67** : 1219-1237

LEHRAIKI A, RACINE C, KRUST A, HABERT R, LEVACHER C. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 372-382

LIVERA G, DELBES G, PAIRAULT C, ROUILLER-FABRE V, HABERT R. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 2006, **324** : 507-521

MASSAAD C, BAROUKI R. An assay for the detection of xenoestrogens based on a promoter containing overlapping EREs. *Environ Health Perspect* 1999, **107** : 563-536

MOCARELLI P, GERTHOUX PM, FERRARI E, PATTERSON DG, JR., KIESZAK SM, et coll. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 2000, **355** : 1858-1863

MORIYAMA K, TAGAMI T, AKAMIZU T, USUI T, SAIJO M, et coll. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87** : 5185-5190

MUÑOZ-DE-TORO M, MARKEY CM, WADIA PR, LUQUE EH, RUBIN BS, et coll. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 2005, **146** : 4138-4147

NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999, **97** : 161-163

OHTAKE F, BABA A, TAKADA I, OKADA M, IWASAKI K, et coll. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 2007, **446** : 562-566

PARIS F, BALAGUER P, TÉROUANNE B, SERVANT N, LACOSTE C, et coll. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit α and β estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002, **193** : 43-49

PARKS LG, OSTBY JS, LAMBRIGHT CR, ABBOTT BD, KLINEFELTER GR, et coll. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 2000, **58** : 339-349

PETTERSSON K, DELAUNAY F, GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 2000, **19** : 4970-1978

SASSI-MESSAI S, GIBERT Y, BERNARD L, NISHIO S, FERRI LAGNEAU KF, et coll. The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *PLoS One* 2009, **4** : e4935

SHANG Y, BROWN M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002, **295** : 2465-2468

SHARPE RM, RIVAS A, WALKER M, MCKINNELL C, FISHER JS. Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) œstrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *Int J Androl* 2003, **26** : 26-36

SHI Y, HON M, EVANS The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99** : 2613-2618

SIMONSEN CR, ROGE R, CHRISTIANSEN U, LARSEN T, BONDE JP. Effects of paternal blood lead levels on offspring sex ratio. *Reprod Toxicol* 2006, **295** : 3-4

SUN H, SHEN OX, WANG XR, ZHOU L, ZHEN SQ, CHEN XD. Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicol In Vitro* 2009, **23** : 950-954

SWEDENBORG E, POWER KA, CAI W, PONGRATZ I, RÜEGG J. Regulation of estrogen receptor β activity and implications in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009, **66** : 3873-3894

VIRTANEN HE, TOPPARI J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Hum Reprod Update* 2008, **14** : 49-58

VOLLE DH, MOUZAT K, DUGGAVATHI R, SIDDEEK B, DÉCHELOTTE P, et coll. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007, **21** : 1014-1027

VOLLE DH, DECOURTEIX M, GARO E, MCNEILLY J, FENICHEL P, et coll. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 2009, **119** : 3752-3764

WILLIAMS K, FISHER JS, TURNER KJ, MCKINNELL C, SAUNDERS PT, SHARPE RM. Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 1227-1235

16
Conclusions et perspectives de recherche

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir à plusieurs niveaux : au niveau de la production d'hormone et de son transport ; au niveau des récepteurs endocriniens, de la régulation de leur expression ou de leur activité.

Parmi les nombreux mécanismes d'actions potentiels des perturbateurs endocriniens, seuls quelques uns ont été associés à des phénotypes au niveau de l'appareil reproducteur. La vaste majorité des études se focalise sur des effets de type anti-androgénique ou œstrogénique sans pour autant démontrer l'implication des récepteurs nucléaires correspondants. Quelques mécanismes précis ont été proposés pour des substances dites à activité œstrogénique ou anti-androgénique. Les substances de type œstrogènique peuvent causer des anomalies structurelles ou fonctionnelles chez le mâle et la femelle au cours du développement alors que les substances de type androgènes affectent essentiellement les femelles et les anti-androgènes essentiellement les mâles.

Un effort de recherche important a été mis en œuvre pour la caractérisation des substances altérant la signalisation des récepteurs nucléaires « canoniques » aux œstrogènes et aux androgènes, mais d'autres modes d'actions doivent être envisagés via des récepteurs hormonaux moins classiques : membranaires (GPR30) ou via d'autres récepteurs nucléaires (PPAR, TR, PXR, CAR, RAR, récepteurs orphelins comme ERRγ, récepteur de la dioxine AhR). Vu la variété des actions spécifiques possibles d'une molécule donnée (stabilité, toxicocinétique, plusieurs récepteurs différents...), il n'est pas étonnant que le lien *in vitro/in vivo* soit difficile à établir.

Deux types de démarches devraient pouvoir être envisagés dans l'avenir :
- étudier les effets d'une molécule donnée dans des modèles génétiques (souris ou zebrafish essentiellement) où un récepteur putatif est inactivé. Par exemple, est-ce que le BPA produit les mêmes types d'effets dans des souris mutantes pour ERα et ERβ ?
- caractériser à l'échelle génomique la réponse à ces molécules en ce qui concerne les gènes régulés.

Connaître l'intégralité des gènes régulés par une molécule donnée permettrait de comparer ce réseau avec ceux des ligands endogènes des récepteurs cibles putatifs et donc d'établir éventuellement des correspondances fortes. On peut

citer à titre d'exemple l'étude de Rosen et coll. (2010)[14]. Ces auteurs montrent par une analyse transcriptomique que le PFOS, un activateur de PPARα, induit dans des souris de type sauvage une signature transcriptionelle typique de l'activation de PPARα mais que dans des souris PPARα déficientes (*knock-out*) on observe toujours une réponse transcriptionelle à PFOS. Ceci suggère que bien que PFOS active effectivement la voie PPARα il existe également des effets PPARα-indépendants médiés par cette molécule.

Par ailleurs, on peut mettre en évidence l'interaction avec plusieurs voies de signalisation pour une même substance « reprotoxique » comme par exemple une perturbation de la signalisation stéroïdienne et de la signalisation rétinoïdienne par l'intermédiaire d'un même récepteur (SHP).

Dans de nombreux cas, une altération du poids ou de la structure des organes reproducteurs, ou de la prolifération des cellules, ou encore de la sécrétion hormonale d'un tissu, est rapportée sans que le mécanisme d'action n'ait été élucidé. Ceci est en partie dû au fait que la connaissance fondamentale, y compris les fonctions des récepteurs nucléaires, est encore incomplète. L'effet sur d'autres voies de signalisation telles que celles des hormones thyroïdiennes, qui sont importantes pour la taille des testicules et la production spermatique (prolifération des cellules de Sertoli) ou des rétinoïdes, acteurs centraux de la détermination du sexe des cellules germinales, est très peu étudié. Enfin, la possible implication de mécanismes altérant le profil de méthylation de l'ADN et la transmission aux générations futures, doit être approfondie.

Un des premiers paramètres compliquant l'analyse des effets des substances « reprotoxiques » est leur fréquente spécificité d'action en fonction du stade de développement. Ainsi, par exemple certaines substances affectent plus fortement ou spécifiquement la gonade fœtale en comparaison de la gonade adulte ou inversement. Il est même fréquent d'observer des différences d'effet à quelques jours d'écart au cours du développement de la gonade fœtale. De telles fenêtres d'action très spécifiques sont couramment décrites pour la gamétogenèse et la stéroïdogenèse fœtale, deux fonctions dont la mise en place est extrêmement dynamique.

Les effets des expositions chroniques à de faibles doses sont mal connus, de même que ceux des mélanges alors que la plupart des expositions sont multiples. Les interactions entre les modes d'action (synergie, opposition, indépendance) des substances présentes lors des multi-expositions, sont elles aussi difficilement analysées.

14. ROSEN MB, SCHMID JR, CORTON JC, ZEHR RD, DAS KP, et coll. Gene expression profiling in Wild-Type and PPARα-Null mice exposed to perfluorooctane sulfonate reveals PPARα-independent effects. *PPAR Res* 2010, **pii** : 794739

La compréhension des mécanismes d'action des substances « reprotoxiques » reste primordiale pour :

- l'établissement de la vraisemblance biologique de la relation de cause à effet ;
- une démarche de toxicologie prédictive ;
- une approche préventive en santé publique.

IV

Méthodes et outils de caractérisation de l'impact de xénobiotiques sur la reproduction

Introduction

Les approches, méthodes et outils classiquement utilisés dans le domaine de la toxicologie reposent sur des définitions, principes et concepts précis et bien établis. L'existence de règles, de procédures, et de tests validés et consensuels représente de ce point de vue un avantage certain sur le plan de la méthodologie à mettre en œuvre en vue de la génération d'informations concernant la connaissance globale et la caractérisation du danger relatives aux substances chimiques. Des méthodes d'études réglementaires ont ainsi été définies et correspondent aux lignes OCDE (Organisation de coopération et de développement économique). Les méthodes OCDE sont au nombre de 6 (plus une 7e dont la validation est en cours) en ce qui concerne l'impact des produits chimiques sur la reproduction (voir annexe 3).

Les tests *in vivo* restent aujourd'hui indispensables pour étudier la toxicité des substances chimiques et évaluer le risque pour l'espèce humaine. Cependant, des méthodes alternatives ont parfois été développées ou sont en cours de développement. Certaines pourront être mises en application dans le cadre du programme REACH (règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques).

Les méthodes d'étude des substances chimiques ayant potentiellement un impact sur la reproduction peuvent être destinées au criblage (*screening)* et/ou à la caractérisation des mécanismes d'action. Les méthodes de criblage incluent des tests *in vivo* et *in vitro*. Les méthodes *in vitro* ne permettent pas de comprendre comment les substances chimiques sont métabolisées et stockées dans l'organisme alors que les études *in vivo* prennent en compte l'ensemble des interactions. En complément des études *in vitro* et *in vivo*, les méthodes *in silico* (telle que QSAR : *Quantitative Structure Activity Relationship*) apportent des informations sur la nature des interactions chimiques entre les perturbateurs et les récepteurs et sont nécessaires à la bonne compréhension de ces mêmes mécanismes. Par la suite, de telles études peuvent être utilisées dans le développement de nouvelles expériences ou lors de la sélection de molécules à tester.

Le développement de lignées cellulaires correspondant à divers tissus reproducteurs permet à l'heure actuelle, d'étudier les mécanismes d'action de substances reprotoxiques potentielles mais pour appréhender le lien avec la fertilité il est nécessaire d'avoir recours à des modèles plus proches de la physiologie tels que les co-cultures, la culture organotypique ou l'expérimentation *in vivo*.

Les effets de mélange (liés à une réalité de multi-exposition), les effets de faibles doses en condition d'exposition chronique, les relations dose-effet non

conventionnelles, ou encore l'existence de cibles biologiques multiples pour une même substance, sont autant d'éléments illustrant la complexité de la problématique d'étude des substances pouvant influencer la fonction de reproduction et de l'évaluation des risques potentiels.

De fait, les approches méthodologiques basées sur la mesure ou le suivi d'un paramètre unique, qu'il s'agisse d'un agent chimique (caractérisation d'exposition, études métaboliques et/ou pharmacocinétiques) ou bien d'un « *endpoint* » clinique (caractérisation du danger, études pharmacodynamiques) particuliers, sont dans ce cas le plus souvent inadaptées. De façon plus générale, émerge un concept de biologie intégrative et une volonté d'appréhender le vivant dans sa complexité.

On assiste donc à des évolutions de la toxicologie vers des approches, outils et concepts plus intégratifs. Dans ce cadre, l'exploitation des technologies de profilage global de type « omique » représente probablement une voie d'évolution majeure pour la toxicologie dans les années à venir. Si les deux premiers niveaux de description des systèmes biologiques que sont la transcriptomique et la protéomique sont déjà assez largement utilisés, le troisième niveau qui est celui du métabolome est encore émergent.

Enfin, l'épidémiologie, discipline visant à décrire la fréquence des pathologies humaines et à identifier leurs causes, contribue de façon centrale à l'identification des dangers et à la quantification des risques pouvant peser sur la fonction de reproduction humaine. Il existe différents types d'études pertinents dans le contexte de la caractérisation des effets possibles de l'exposition à des perturbateurs endocriniens sur des paramètres biologiques ou la survenue d'événements de santé[15] . Outre la description de la fréquence des pathologies et la caractérisation de l'impact des facteurs environnementaux sur la santé humaine, l'épidémiologie environnementale constitue une source de données importantes sur les niveaux d'exposition des populations aux polluants environnementaux et ses déterminants sociaux, géographiques et comportementaux.

15. Pour une présentation succincte et accessible de l'épidémiologie environnementale, on pourra se reporter à la brochure « Repères en épidémiologie » éditée par l'Inserm : http://www.inserm.fr/content/download/6073/48133/file/repere_epidemiologie.pdf

17
Méthodes d'étude *in vitro*

Les tests *in vitro* sont des outils performants pour réaliser des criblages d'activité de substances environnementales capables de perturber les fonctions endocrines. Il existe de nombreux tests *in vitro*, certains permettent de caractériser l'activité d'une substance vis-à-vis d'un récepteur hormonal (mesure biochimique de la liaison à un récepteur, étude de l'expression de gènes cibles endogènes ou rapporteurs dans des lignées cellulaires), d'autres permettent de caractériser l'effet vis-à-vis d'un paramètre de la fonction de reproduction (apoptose ou prolifération des cellules issues d'un organe participant à la reproduction, dosage des taux d'hormones sexuelles sécrétées par des cellules endocrines).

Ces tests permettent de mesurer une activité *in vitro* mais il est ensuite nécessaire de confirmer cette activité par des tests *in vivo*.

Méthodes biochimiques mesurant la liaison à un récepteur nucléaire

Parmi les méthodes biochimiques, le test le plus répandu est celui de la compétition de liaison pour un ligand radiomarqué au récepteur nucléaire. La source de récepteur peut être du récepteur extrait à partir d'organes (utérus d'agnelle), de cellules (lignée de cancer du sein MCF-7) ou recombinant produit dans *E. coli* ou dans baculovirus pour les ER, AR, PPAR ou TR. Le ligand radioactif est de l'œstradiol pour les ER, du R1881 (méthyltriénolone) ou de la dihydrotestostérone pour AR, de la rosiglitazone pour PPAR γ ou de l'hormone thyroïdienne pour TR. Ces ligands sont commercialisés sous forme tritiée. Le principe de la technique consiste à mesurer le déplacement du ligand radioactif lié au récepteur par la molécule à tester. L'expérience permet de calculer une affinité relative (en comparaison avec celle du ligand de référence) pour le récepteur. Elle renseigne donc sur l'affinité mais pas sur la nature agoniste ou antagoniste de la molécule. Ces tests sont actuellement validés ou en cours de validation par l'ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) ou l'EPA (*US Environmental Protection Agency*).

Des variantes de ce test utilisant des ligands fluorescents sont possibles. Ces tests ont été développés pour les adapter au format plaques de 96-, 384- ou

1 536 puits. L'avantage de ces variantes est qu'elles sont mieux adaptées à un criblage de molécules à haut débit et qu'elles n'utilisent pas de radioactivité.

Les récepteurs nucléaires selon qu'ils sont liés à une molécule agoniste ou antagoniste adoptent une conformation agoniste ou antagoniste et lient soit des facteurs d'activation de la transcription soit des facteurs de répression. Des techniques fluorescentes permettent également d'étudier l'interaction entre un récepteur et des petits peptides mimant ces coactivateurs ou ces corépresseurs. Il est ainsi possible de déterminer si une molécule est agoniste ou antagoniste par ces techniques qui ne sont pas encore validées mais sont largement utilisées par l'industrie pharmaceutique.

L'inconvénient majeur des techniques biochimiques est qu'elles ne permettent pas de mesurer l'activité de perturbation endocrine de métabolites des substances testées.

Méthodes mesurant des effets cellulaires

Apoptose et fragmentation de l'ADN

L'apoptose peut être mesurée par de nombreuses méthodes, cytométrie de flux, migration en gel d'agarose (échelle d'ADN), immunohistochimie, Western Blot, dosage d'activités enzymatiques (caspases). Quelques techniques sont couramment employées. Au sein des tissus, l'apoptose peut être recherchée par la détection immunologique des formes clivées/activées des caspases, protéases initiatrices ou exécutrices de l'apoptose. Par exemple, la détection immunocytochimique de la caspase-3 clivée, sert couramment à mettre en évidence la présence de cellules apoptotiques. Ceci permet par exemple de connaître le taux (pourcentage) d'un type cellulaire entré en apoptose. L'activation d'autres caspases (8 ou 9) permet de raffiner l'étude en précisant les voies apoptotiques activées : intrinsèques ou extrinsèques. La recherche de l'activation de caspases peut également être effectuée par Western Blot, qui permet de visualiser le clivage activateur de ces enzymes ou par la mesure de l'activité enzymatique des caspases à l'aide de substrats fluorescents. Cependant, dans ces cas il est difficile de préciser le type cellulaire atteint au sein de tissus généralement hétérogènes. Une autre façon de mesurer l'apoptose est la détection de la fragmentation de l'ADN. Ceci est couramment réalisé par la technique Tunel (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) qui marque les extrémités 3'OH libres de l'ADN. La technique Tunel détecte la dernière étape de l'apoptose et peut se pratiquer sur des coupes de tissus.

Mesure de la prolifération cellulaire

Le cycle cellulaire est constitué par la succession de quatre phases : G1, S, G2 et M. La prolifération cellulaire est fréquemment mesurée dans des lignées

cellulaires ou au sein d'un tissu par la détection immunologique de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen)*, Ki67, pRb, pH3, p27, p21 ou par la mesure de l'incorporation de BrdU (5, bromo-desoxy-uridine). Dans la plupart des cas, l'index de prolifération est défini comme le pourcentage des cellules, d'un même type cellulaire présentant un marquage pour l'un de ces antigènes. Ces marqueurs sont fréquemment utilisés en oncologie. Le BrdU est un analogue de thymidine qui s'incorpore ou cours de la phase S, phase de réplication de l'ADN. Ki67 et PCNA sont des marqueurs de cellules en prolifération : PCNA est une protéine qui fait partie du complexe de réplication de l'ADN, le réplisome ; Ki67, est un facteur nucléaire exprimé tout au long du cycle cellulaire mais absent des cellules en quiescence. La pH3 ou phospho-histone H3 correspond à l'histone 3 phosphorylée. Cette phosphorylation se produit au moment de la phase M, phase de division, du cycle cellulaire. La détection de pH3 permet donc de détecter les cellules mitotiques. La pRb ou protéine du rétinoblastome bloque le cycle cellulaire en phase G1 en séquestrant le facteur de transcription E2F. Enfin, p21 et p27 sont également des freins cellulaires en relation avec les complexes cyclines/CDK.

Dosages hormonaux RIA/ELISA

Les dosages hormonaux concernant les principaux stéroïdes sont fréquemment effectués sous forme de dosage radio-immunologique (RIA), mettant en compétition un stéroïde « froid » avec le même stéroïde sous une forme marquée, radioactive pour un anticorps spécifique. Ces méthodes ont généralement de bonnes sensibilités, de l'ordre de quelques ng/ml. Des dosages sans compétition, dans lesquels l'anticorps est en excès sont également possibles. Depuis quelques années, l'utilisation de la radioactivité tend à diminuer et est remplacée par des dosages reposant sur l'activité enzymatique (Elisa) ou sur la fluorescence.

Pour la mesure de la testostérone, une donnée importante est de savoir si la mesure est effectuée à partir du plasma ou dans le testicule même. En effet, les taux de testostérone intra-testiculaire sont beaucoup plus importants que les taux circulants et également moins variables.

Technique Comet : mesure des dommages/réparation de l'ADN

Les dommages à l'ADN peuvent être mesurés par la technique Comet. Cette méthode est fréquemment appliquée aux spermatozoïdes dans lesquels l'intégrité de l'ADN est primordiale pour la transmission d'une information génétique de bonne qualité à la génération suivante. La technique Comet (ou *single cell gel electrophoresis*) repose sur la capacité à « dérouler » l'ADN nucléaire dans des conditions de pH élevé puis une électrophorèse permettra de faire sortir les brins d'ADN brisés. Ces brins forment alors une queue d'un seul côté de la tête (noyau) qui donne ainsi l'image caractéristique de « comète ». L'ADN est alors quantifié à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image

qui détermine la quantité d'ADN qui a migré à la « queue » et l'ADN restant à la « tête ».

Méthodes *in vitro* sur cultures cellulaires

Les méthodes *in vitro* sur cultures cellulaires sont un bon compromis entre les méthodes biochimiques et les méthodes *in vivo*. Les tests sur cellules permettent de mesurer l'activité de perturbation endocrine de métabolites des substances testées, en fonction des capacités métaboliques des cellules utilisées. Elles intègrent plusieurs actions des perturbateurs endocriniens (métabolisme, transport, liaison aux protéines, activation de récepteurs, expression de gènes). Différents types de tests existent pour mesurer les activités œstrogéniques ou androgéniques de composés chimiques.

Étude de l'expression de gènes endogènes

Ces techniques consistent à mesurer l'expression de protéines qui sont sous le contrôle des œstrogènes ou des androgènes. Pour les œstrogènes, c'est par exemple la vitellogénine dans les hépatocytes de truite ou le récepteur de la progestérone, la protéine pS2 dans des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7. Pour les androgènes, c'est par exemple la protéine *spiggin* chez le poisson épinoche et la PSA (antigène spécifique de la prostate) dans les lignées cellulaires de cancer de prostate LNCAP.

La mesure de l'expression se fait par des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR quantitative), biochimiques (western) ou immunologiques. Ces techniques ne sont pas toujours adaptées à un criblage à haut débit.

Un des tests les plus répandus utilisant une réponse endogène de cellules est le E-screen (Soto et coll., 1995). Ce test consiste à mesurer l'effet de molécules sur la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7 (ER α positives) qui est dépendante des œstrogènes. Ce test permet de déterminer la nature agoniste (la prolifération est activée) ou antagoniste (la prolifération en présence d'œstradiol est inhibée) d'une molécule. L'inconvénient de ce test est que la toxicité d'un produit peut masquer une activité agoniste ou laisser croire qu'il est antagoniste.

Une variante de ce test, le A-screen, permet de mesurer l'activité androgénique d'une molécule (Szelei et coll., 1997). Ce test est réalisé à partir de cellules MCF-7 qui sur-expriment le récepteur des androgènes (AR). Dans ces cellules, la prolifération induite par l'œstradiol est inhibée par les ligands agonistes de AR. Le test consiste donc à traiter des cellules par des concentrations saturantes d'œstradiol et ensuite à mesurer l'effet antiprolifératif des molécules à tester. Si un effet antiprolifératif est observé, il ne peut pas être dû à un effet anti-œstrogénique, car l'œstradiol est présent en forte concentration, mais à un effet passant par AR.

De même, le T-screen est un test de prolifération qui permet de mesurer un effet agoniste ou antagoniste de ligands des récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR). Ce test est réalisé dans la lignée cellulaire pituitaire de rat GH3 (Gutleb et coll., 2005).

Pour tester l'activité de ligands du récepteur PPAR γ, la lignée cellulaire la plus utilisée est la lignée de fibroblastes murins NIH3T3-L1. Ces cellules, après un prétraitement permettant un début de différenciation adipocytaire, ont la capacité de se différencier complètement en adipocytes après un traitement avec un ligand de PPAR γ comme la rosiglitazone (Tontonoz et coll., 1994). La différenciation peut alors être mesurée en colorant les gouttelettes lipidiques à l'huile rouge ou en mesurant l'expression de deux gènes cibles de PPAR γ, PPAR γ lui-même et l'apolipoprotéine A2.

La forme active de ce récepteur étant l'hétérodimère RXR-PPAR γ, cette technique a également permis de mesurer l'activité de ligands environnementaux de RXR comme les organoétains.

Étude de l'expression de gènes rapporteurs

La technique consiste à déterminer le taux d'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un récepteur nucléaire. Réalisée de façon transitoire ou stable dans des levures ou dans des cellules de poisson ou des cellules humaines, elle est devenue la technique la plus répandue pour tester avec un grand débit l'activité œstrogénique ou androgénique de molécules. Les avantages des modèles de levure résident dans le fait qu'ils sont plus facilement manipulables. Leurs inconvénients sont liés aux différences de perméabilité et de métabolisme avec les cellules humaines. C'est pour ces raisons que les modèles qui se développent le plus sont des modèles cellulaires humains qui expriment soit une luciférase soit une enzyme avec un substrat fluorescent (bêta-galactosidase) sous le contrôle d'un promoteur qui répond aux œstrogènes ou aux androgènes.

De nombreux modèles cellulaires existent. Deux lignées cellulaires bioluminescentes dont deux (MELN pour les œstrogènes, PALM pour les androgènes) sont actuellement en validation à l'ECVAM (Escande et coll., 2006 ; Molina-Molina et coll., 2008 ; Kinani et coll., 2010). Il existe également des lignées commercialisées, ER Calux ou AR Calux (Van der Linden et coll., 2008), ER, AR, TR ou PPAR γ Geneblazer ou disponibles à l'ATCC (T47D-Kb2luc pour ER α et MDAkb2 pour AR). Alors que ces modèles issus de transfection stable ne permettent d'étudier qu'une cible à la fois, une technique originale (développée par la compagnie Attagene) permet de discriminer l'effet d'une molécule sur plus d'une cinquantaine de cibles à la fois. Tous ces différents modèles cellulaires utilisant soit une détection par luminescence soit par fluorescence sont bien adaptés à un criblage à haut débit de la nature agoniste ou antagoniste œstrogénique ou androgénique de molécules.

Méthodes utilisant des cultures d'organes

À l'exception de lignées de cellules cancéreuses, peu de modèles *in vitro* fiables ont été développés pour étudier la fonction de reproduction humaine. La culture organotypique de gonades fœtales est une alternative ; bien que sortie du contexte endocrinien, celle-ci permet de tester directement l'effet d'une substance donnée sur une gonade fœtale humaine. Ce type de modèle requiert un partenariat privilégié entre les laboratoires capables de la mettre en œuvre et des services hospitaliers ce qui, outre le peu de matériel disponible, fait que très peu d'équipes utilisent de tels protocoles. Ceux-ci sont donc peu standardisés à l'heure actuelle.

La culture organotypique est le fait de cultiver tout ou une partie d'un tissu sans procéder à une dissociation cellulaire. Ce type de modèle comporte de nombreux avantages. Il permet de conserver l'architecture tri-dimensionnelle du tissu et les interactions paracrines entre différents types cellulaires. Cette conservation des interactions paracrines est primordiale pour reproduire fidèlement le développement d'un tissu et est généralement perdue lors de cultures primaires de cellules dissociées. Par exemple, dans la gonade, le développement des cellules germinales est étroitement dépendant du dialogue entretenu par celles-ci avec les cellules somatiques. Ce modèle permet en outre de mesurer l'effet d'une substance directement sur le tissu biologique d'intérêt en s'affranchissant des effets dus à une action indirecte via un autre tissu.

La culture organotypique a été réalisée pour l'étude des gonades au cours du développement chez les rongeurs. Ainsi le développement du testicule fœtal et postnatal de rat ou de souris peut être reproduit de manière fidèle dans un milieu de composition définie (Livera et coll., 2006) et les fonctions de la gonade telles que la sécrétion de testostérone ou la prolifération des cellules germinales, précisément mesurées.

Des modèles semblables ont été proposés pour l'étude du développement ovarien, des gonades de grands mammifères et surtout pour les gonades fœtales humaines. Notons qu'il s'agit ici du seul modèle expérimental permettant de démontrer l'effet de substances reprotoxiques sur le testicule fœtal humain (Lambrot et coll., 2006).

Chez les rongeurs, ce modèle permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisés puisque pour chaque fœtus un testicule sert de témoin et le testicule contralatéral du même animal est exposé à un taux précisément connu de la substance à tester, taux qui ne dépend pas du métabolisme ou du catabolisme spécifique de l'espèce l'animale. Ainsi pour une femelle gestante, plusieurs doses peuvent être testées en utilisant l'ensemble de ces fœtus. Les paires de gonades de chaque fœtus peuvent être exploitées l'une servant de témoin (non exposée). L'utilisation du testicule contralatéral du même animal permet également une mesure très fine des effets, limitant la variation

inter-individus, et donc le nombre d'animaux pour atteindre un effet statistiquement significatif. Enfin, *in vivo* le taux circulant du (ou des) composé(s) actif(s) peut être différent d'une espèce à l'autre ou même d'un sexe à l'autre pour l'exposition à dose équivalente à un même composé ce qui limite les comparaisons, tel n'est pas le cas dans ce modèle.

Notons cependant qu'il existe des limites à la pertinence de ce type de modèle. Ainsi de nombreuses variations de protocoles inter-laboratoires subsistent aboutissant parfois à l'obtention de résultats sensiblement différents pour une même substance. Par ailleurs, si tester l'effet direct d'une substance sur un tissu donné est un avantage, la réponse à cette même substance dans le contexte du dialogue endocrinien *in vivo* (par exemple entre la gonade et l'axe hypothalamus et hypophyse) peut parfois être différente. Enfin, dans ce modèle, en général, seul l'effet du métabolite principal d'une substance est mesuré alors que *in vivo* les gonades peuvent être exposées à une famille complexe de métabolites correspondant à une seule substance mère.

En résumé, la culture organotypique est un outil qui permet d'appréhender de manière fine les effets d'une substance et de détailler son mécanisme d'action sur les fonctions physiologiques. Elle ne peut pas remplacer les tests *in vivo* mais permet à l'heure actuelle la mise en évidence de mécanismes d'actions de substances reprotoxiques. Dans un futur proche, la combinaison de modèles de culture organotypique et d'animaux transgéniques pourrait permettre d'identifier au sein d'un tissu donné l'activité de substances androgéniques ou œstrogéniques et surtout de démontrer le mode d'action à l'aide de souris mutantes pour différents récepteurs (récepteur aux androgènes, récepteurs aux œstrogènes, récepteurs PPAR...).

L'étude de la spermatogenèse requiert *a minima* des systèmes complexes de co-culture de cellules de Sertoli, cellules somatiques nourricières polarisées, et de cellules germinales. Un type de modèle réunissant ces paramètres a été publié par le groupe de Philippe Durand pour l'étude de la spermatogenèse du rat. Celui-ci permet également de restreindre la consommation d'animaux (Perrard et coll., 2009). Notons cependant qu'il existe de nombreux types cellulaires différents dans les gonades (cellules germinales, cellules de Sertoli, cellules de Leydig, cellules péritubulaires, macrophages, cellules endothéliales...) et que seule la culture organotypique permet de préserver le dialogue entre tous. Ce dernier modèle reste aujourd'hui limité à l'étude des gonades fœtales ou néonatales.

Bibliographie

ESCANDE A, PILLON A, SERVANT N, CRAVEDI JP, LARREA F, et coll. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor α or β. *Biochem Pharmacol* 2006, **71** : 1459-1469

GUTLEB AC, MEERTS IATM, BERGSMA JH, SCHRIKS M, MURK AJ. T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005, **19** : 231-238

KINANI S, BOUCHONNET S, CREUSOT N, BOURCIER S, BALAGUER P, et coll. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ Pollut* 2010, **158** : 74-83

LAMBROT R, COFFIGNY H, PAIRAULT C, DONNADIEU AC, FRYDMAN R, et coll. Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91** : 2696-2703

LIVERA G, DELBES G, PAIRAULT C, ROUILLER-FABRE V, HABERT R. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 2006, **324** : 507-521

MOLINA-MOLINA JM, ESCANDE A, PILLON A, GOMEZ E, PAKDEL F, et coll. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **23** : 384-395

PERRARD MH, PRISANT N, GEOFFROY-SIRAUDIN C, SEGRETAIN D, POINTIS G, et coll. Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. *Folia Histochem Cytobiol* 2009, **47** : S89-S94

SOTO AM, SONNENSCHEIN C, CHUNG KL, FERNANDEZ MF, OLEA N, SERRANO FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995, **103** (suppl 7) : 113-122

SZELEI J, JIMENEZ J, SOTO AM, LUIZZI MF, SONNENSCHEIN C. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 1997, **138** : 1406-1412

TONTONOZ P, HU E, SPIEGELMAN BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994, **79** : 1147-1156. Erratum in: *Cell* 1995, **80** following 957

VAN DER LINDEN SC, HERINGAMB, MAN HY, SONNEVELD E, PUIJKER LM, et coll. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 5814-5820

18
Méthodes d'études *in vivo*

Seule l'expérimentation *in vivo* permet de mesurer l'atteinte de la fertilité des animaux et d'intégrer d'éventuelles altérations dans le dialogue entretenu par l'ensemble des organes assurant la complexité de la fonction de reproduction. Au-delà de la fertilité, de nombreux autres paramètres reliés à la fonction de reproduction peuvent être mesurés *in vivo*, tels le poids des gonades ou des tissus du tractus génital, la sécrétion d'hormones ou l'altération morphologique des tissus... L'avantage des modèles *in vivo* est d'intégrer la totalité des effets potentiels d'un perturbateur donné et de ses métabolites dans un contexte physiologique. Ainsi par exemple, le lien entre les organes est conservé et les répercussions d'un composé sur un étage de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique peuvent être appréhendées dans leur globalité (ce qui n'est pas le cas dans un modèle *in vitro*). En revanche, de nombreuses précautions s'imposent dans la transposition des données inter-espèces et en fonction des protocoles utilisés. Plusieurs paramètres, tels le choix de l'espèce ou de la lignée, le mode d'administration, la fenêtre d'exposition... sont à prendre en considération dans les données issues des études *in vivo*.

Études chez l'animal

Les études chez l'animal, le plus souvent le rongeur, présentent une grande diversité dans le choix des espèces et des lignées, les modes d'administration des substances chimiques et les périodes d'exposition.

Choix des espèces et lignées

Dans l'optique de la transposition des données à l'espèce humaine, le choix de l'espèce animale dans laquelle les études *in vivo* sont conduites est important. La plupart des travaux *in vivo* sont menés chez les rongeurs. Du point de vue de la régulation des fonctions de reproduction (gamétogenèse et stéroïdogenèse), on peut noter un grand degré de conservation entre la plupart des espèces mammaliennes. Cependant, chez les rongeurs, certains mécanismes diffèrent sensiblement. Ainsi par exemple, pour l'ovogenèse, le rat et la souris sont des espèces poly-ovulantes (qui produiront plusieurs ovocytes matures à

chaque cycle) ce qui n'est pas le cas de l'ovaire humain. De plus, la durée de la gestation est très courte chez les rongeurs, 19 à 21 jours, et aboutit à la naissance de jeunes très immatures, ce qui est moins le cas chez les grands mammifères tels l'homme. Cette dernière donnée est à prendre en considération car le développement des gonades est également affecté. À titre d'exemple, la folliculogenèse débute pendant la vie fœtale chez l'homme et pendant la vie postnatale chez les rongeurs. On comprendra donc que les fenêtres d'expositions ne suivent pas un parallélisme strict entre les espèces ; fréquemment une exposition périnatale (fœtale et début de vie postnatale) chez les rongeurs recouvre des événements similaires à une exposition fœtale chez l'être humain. Certaines espèces, tels les ruminants, peuvent apparaître plus proches de l'être humain pour ces paramètres. Cependant, la manipulation de ces modèles, longue et onéreuse, limite grandement l'usage de tels animaux dans le cadre d'étude systématique de toxicologie. Notons enfin que sous bien des aspects la spermatogenèse est une fonction sensiblement plus fragile chez l'homme que chez de nombreuses autres espèces. À titre de comparaison, il existe très peu de spermatozoïdes présentant des formes anormales chez la souris alors que ces dernières sont fréquentes chez l'homme. Par ailleurs, à moins de certains fonds génétiques bien particuliers, tel le fond SV129, il n'existe quasiment pas de tumeurs germinales dans le testicule murin, alors qu'il s'agit du cancer le plus fréquent de l'homme jeune.

Au sein d'une même espèce de rongeur, il est à noter également l'existence de différences inter-lignées pour certains paramètres sensibles à l'effet de substances reprotoxiques. Par exemple, en réponse à une exposition *in utero* aux phtalates (DBP), les rats des lignées Wistar présentent des taux de cryptorchidie plus élevés et des taux d'agénésie épididymaire moindre que les rats de lignée Sprague-Dawley (Howdeshell et coll., 2008). On comprend donc la difficulté de conclure à l'absence d'effet sur certains paramètres de la reproduction quand une seule lignée est utilisée.

Chez les vertébrés aquatiques, il existe des différences beaucoup plus marquées au niveau de la régulation hormonale des fonctions de reproduction bien que les processus cellulaires reprennent toujours des thèmes communs (méiose, fécondation…). Par exemple, la maturation ovocytaire ou la spermatogenèse peuvent être régulées par des stimuli hormonaux différents. Chez de nombreux poissons, c'est la 11-céto-testostérone qui est le principal androgène circulant.

Modes d'administration

Dans le cadre des perturbateurs endocriniens où la voie d'exposition principale est fréquemment la voie alimentaire, il semble légitime de privilégier cette voie dans les protocoles d'expérimentation animale. Cependant, il est parfois difficile de connaître avec certitude la quantité de nourriture ingérée par les animaux de laboratoire et l'introduction de substances exogènes peut modifier la prise alimentaire, c'est pourquoi de nombreux auteurs choisissent

de gaver les animaux. Cette approche permet de mieux contrôler la quantité administrée mais peut également être considérée comme un stress supplémentaire de l'animal, paramètre additionnel pouvant modifier la réponse à un perturbateur endocrinien. Ainsi par exemple, les glucocorticoïdes semblent amplifier les effets des phtalates sur le testicule fœtal (Drake et coll., 2009) et il semble donc légitime d'imaginer que le stress maternel puisse contribuer aux altérations induites par ces perturbateurs. D'autres expérimentateurs choisissent d'injecter directement le composé ou mieux le dérivé actif du composé à tester ce qui n'est pas forcément à considérer comme un défaut de protocole. En effet, de très nombreuses différences de toxicocinétique sont décrites d'une espèce à l'autre et il est difficile d'appréhender le rôle des métabolites actifs lorsque ceux-ci sont produits en proportions variables chez deux espèces différentes. En contrepartie, lorsqu'un seul métabolite est administré on peut s'interroger sur le rôle du composé parent qui peut fréquemment générer toute une famille de dérivés aux effets multiples.

Ce dernier point est à rapprocher également de la notion d'environnement contrôlé ou dépourvu de contaminants fréquemment proposée dans le cadre des études *in vivo*. Effectivement, il est important de placer les animaux de laboratoire dans des cages et des litières spéciales dépourvues de contaminants œstrogéniques ou de les nourrir avec un régime ne contenant pas de phytoœstrogènes (par exemple sans soja). Mais ce type de régime ne reflète pas les conditions réelles d'exposition multiple de l'être humain. Par ailleurs, il n'est même pas certain pour de nombreux perturbateurs que leur mode d'action *in vivo* soit de type œstrogénique.

Enfin, parmi les modes d'administration, quelques expérimentateurs choisissent d'utiliser un système de pompes osmotiques greffées sous la peau de l'animal et délivrant quotidiennement une dose donnée (Vandenberg et coll., 2007). Bien que controversé, ce mode d'administration permet de limiter la manipulation des animaux, notamment lors de la gestation ou pendant le début de la lactation (et donc de limiter le stress attenant à ces manipulations). Il permet également comme avec les injections de délivrer une quantité précise.

Dans tous les cas et quel que soit le mode d'administration ou l'espèce, il est intéressant de connaître le taux circulant du composé administré et de ses principaux dérivés (métabolites actifs). Ce dosage est un paramètre qui prime sur le mode d'administration pour comparer avec les taux retrouvés chez l'homme ou pour corréler les effets *in vitro* aux modes d'actions dérivés d'études *in vitro*.

Fenêtre d'exposition

La notion de fenêtre d'exposition dépend de deux principaux paramètres, d'une part les paramètres qui sont mesurés et d'autre part la cinétique de la réponse. Ainsi par exemple dans le cadre des études sur la spermatogenèse, il

est couramment admis qu'une exposition doit couvrir un cycle complet de spermatogenèse (53 jours chez le rat) pour pouvoir voir les conséquences d'une altération ayant pu toucher n'importe quel stade de la spermatogenèse. Dans le cadre des études développementales, la question est plus équivoque. Bien que la vie fœtale apparaisse comme une période particulièrement critique pour la mise en place de la fonction de reproduction, il n'est pas évident qu'une exposition ponctuelle ou durant quelques jours de vie fœtale chez un rongeur reflète fidèlement l'exposition humaine, chronique et éventuellement tout au long de la vie.

Par ailleurs, le développement très lent des tissus reproducteurs chez l'être humain suggère qu'un même type cellulaire peut être exposé pendant des périodes parfois très supérieures à ce qui peut être reproduit à l'aide des modèles rongeurs. À titre d'exemple, la prolifération des ovogonies (précurseurs mitotiques des gamètes femelles) dans l'ovaire fœtal humain débute à la sixième semaine de gestation et se termine aux environs de la 28e semaine, soit plus de 150 jours, alors que chez la souris celle-ci ne dure que du 11e jour post-conception au 14e, soit à peine 3 jours. Dans ce cadre, est-ce qu'une exposition à faible dose durant une période presque cinquante fois plus longue est comparable à une exposition à la même dose ou faut-il la comparer à une exposition aiguë mais à une dose plus forte ?

Témoins positifs

L'inclusion d'un témoin positif est toujours un élément de comparaison intéressant dans une étude car il permet de vérifier l'exactitude et la sensibilité des paramètres mesurés lorsque ceux-ci sont connus pour être affecté par ce témoin. Ainsi dans le cas des perturbateurs endocriniens suspectés d'avoir au moins une activité de type œstrogénique, le DES est couramment utilisé comme témoin positif. Cependant, le témoin positif est aussi un biais expérimental. En effet, dans la plupart des cas le mode d'action *in vivo* du composé testé est inconnu et choisir par défaut un composé œstrogénique n'est pas forcément plus pertinent que d'exposer un animal à des radiations ionisantes. En d'autres termes, lorsque le mode d'action de la substance étudiée est inconnu au niveau moléculaire il est plus intéressant d'avoir un témoin positif affectant le paramètre étudié qu'un supposé témoin positif dont les effets sur les paramètres mesurés sont incertains. À titre d'exemple, de nombreux auteurs utilisent la flutamide, un anti-androgène non-stéroïdien, comme témoin positif lors d'études au sujet des phtalates dans le testicule fœtal (Mylchreest et coll., 2002). Cependant, les effets des phtalates apparaissent indépendants des récepteurs aux androgènes (Lehraiki et coll., 2009). Quelle est donc la pertinence de la flutamide dans ce cas précis ? Il s'agit plus d'un élément de comparaison qu'à proprement parler d'un témoin positif. Par ailleurs, les phtalates ont été décrits comme augmentant l'apoptose des cellules germinales, les rayons γ également et ce de manière répétée et en détail depuis plus de 30 ans. Est-ce que pour ce paramètre l'exposition aux

rayonnements ionisants n'est pas un contrôle positif pertinent ? Cet exemple est certes un peu extrême et un témoin positif de nature semblable (composé chimique) est généralement préférable, mais permet d'illustrer la difficulté d'inclure un témoin positif a priori dans une étude. L'absence de témoin positif « valable » dans certaines études ne peut pas être considérée comme un critère d'exclusion lorsque des effets du composé d'intérêt sont décrits. En revanche, un témoin positif (peu importe sa nature) est très important lorsque peu ou pas d'effets sont rapportés.

Une notion parfois plus intéressante que l'inclusion d'un témoin dont on suppose qu'il a un mécanisme d'action proche du perturbateur testé est l'inclusion de fortes doses qui même si elles ne renseignent pas sur l'activité du composé aux doses proches de celles retrouvées dans l'environnement peuvent prouver que le composé utilisé est bien actif (même sur des paramètres indépendants de la fonction de reproduction).

En résumé, il est très difficile de statuer sur la qualité d'une étude *in vivo*. Une étude peut être considérée comme informative si le taux du composé administré (et/ou de ses métabolites) a été dosé au cours du protocole, si elle rapporte des effets précis et détaillés corroborant les mécanismes d'action supposés *in vitro* ou des effets similaires à ceux décrits dans une autre espèce. En cas d'absence d'effet sur un paramètre, l'inclusion d'un témoin positif altérant le(s) paramètre(s) étudié(s) ou/et un effet de la substance testée sur un autre paramètre permet d'estimer la sensibilité de la mesure et l'activité de la substance.

Paramètres phénotypiques recherchés dans les études

Les études chez l'animal (rongeurs) peuvent s'intéresser à un grand nombre de paramètres phénotypiques. Le tableau 18.I résume les principaux et présente les limites de chacune des approches.

Tableau 18.I : Paramètres phénotypiques recherchés dans les études chez le mammifère mâle

Paramètres phénotypiques	Points critiques
Paramètres morphologiques Poids testicules, épididymes, prostate et vésicules séminales	Le poids testiculaire ne reflète que les altérations majeures de la spermatogenèse (moins précis qu'un comptage de cellules apoptotiques) Le poids des épididymes, prostate et vésicules séminales peut refléter une action anti-androgénique mais également moins précis qu'un dosage de testostérone
Paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité % Anomalies	Chez les rongeurs, les paramètres spermatiques sont plus robustes (viabilité élevée et peu de formes anormales) que chez l'être humain

Paramètres phénotypiques	Points critiques
Anomalies morphologiques Distance anogénitale Hypospadias Cryptorchidie Présence de mamelons	Nécessite des mesures précises en période postnatale et risque de variabilité inter-expérimentateurs Peuvent mettre en jeu des mécanismes développementaux indépendants des hormones stéroïdes
Fertilité	Intègre des fonctions multiples, n'indique pas le processus affecté (gamétogenèse, maturation des gamètes, fécondation, implantation, développement)
Dosages hormonaux Testostérone, LH, FSH, œstradiol	Les dosages de testostérone intra-testiculaires sont moins variables que les dosages sériques (mais nécessite la destruction du tissu)
Puberté Âge à la séparation du prépuce	Peut être influencé par un changement de comportement alimentaire
Histologie	Nécessite un expert pour identifier les lésions pathologiques Ne dénombre pas un type cellulaire donné, ni son activité proliférative ou apoptotique
Immunohistochimie	Repose sur la spécificité des anticorps et la connaissance de marqueurs (utile pour quantifier précisément un type cellulaire spécifique à l'aide d'un marqueur, son état de différenciation ou son activité)

Tests *in vivo* de mesure de la perturbation endocrinienne

Mesure de l'expression de gènes endogènes

Ces tests consistent à traiter des animaux génétiquement non modifiés (poissons, amphibiens, petits mammifères) par des molécules à activité potentiellement œstrogénique ou androgénique et à étudier ensuite l'expression de gènes endogènes ou des changements de phénotypes.

Deux types réglementaires existent pour mesurer une activité œstrogénique ou androgénique. Le test utérotrophique chez la souris ou le rat consiste à mesurer l'augmentation du poids de l'utérus après 3-7 jours de traitement par de l'œstradiol ou le produit dont l'activité œstrogénique est à tester.

Le test de Hershberger chez le rat consiste à mesurer l'augmentation du poids d'organes comme le gland pénien, les vésicules séminales ou la prostate ventrale après 10 jours de traitement par un produit dont l'activité androgénique est à tester. L'inconvénient majeur de ces tests est qu'ils sont assez lourds et coûteux donc peu adaptés à l'étude d'un grand nombre de molécules. Il est également à noter que des molécules à agonisme partiel ne répondent pas forcément à ces tests. C'est le cas du bisphénol A qui s'est avéré négatif pour le test utérotrophique. Les progrès technologiques (facilitant la manipulation et diminuant le coût) réalisés dans la mesure de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative devraient faciliter l'étude de l'expression de gènes endogènes *in vivo*.

Modèles d'animaux transgéniques

D'autres tests non encore validés par l'ECVAM utilisant la technique de gène rapporteur *in vivo* ont été établis ces dernières années. Ces tests utilisent des animaux transgéniques (zebrafish, xénope ou souris) dont le gène de la luciférase ou de la GFP (*green fluorescent protein*) est sous le contrôle d'un promoteur activable par les œstrogènes ou les androgènes. Les avantages de ces modèles sont que l'on peut suivre l'activité d'un composé sur l'ensemble de l'organisme. Cela peut théoriquement permettre de déterminer si une molécule est active dans un organe et pas dans un autre (cas du bisphénol A). Comme tous les modèles *in vivo*, ils présentent l'avantage d'intégrer le métabolisme et donc d'étudier la dégradation d'un produit actif ou la transformation d'un produit inactif en produit actif. Un des inconvénients de ces modèles est que le récepteur est d'origine animale et donc différent du récepteur humain. Pour les récepteurs des œstrogènes et des androgènes, la différence interespèce est mineure. De plus, il est possible d'humaniser ces animaux en exprimant le récepteur humain au lieu du récepteur animal. Les différents modèles animaux présentent chacun des avantages respectifs. Au stade larvaire, les modèles zebrafish et xénope peuvent être manipulés dans des plaques de culture de format 96 puits. Tant que les larves ne se nourrissent pas, ces modèles sont considérés comme étant non *in vivo*. Leur transparence rend plus facile la détection de la fluorescence ou de la luminescence. De tels modèles existent pour les récepteurs ER chez le zébrafish (AromataseB-GFP et ERE-Luciférase) (Legler et coll., 2002 ; Tong et coll., 2009) et pour les récepteurs TR chez le xénope (TH/bZIP-GFP) (Fini et coll., 2007).

Les modèles de souris présentent l'avantage d'être plus proches de l'homme. L'équipe d'Adriana Maggi a ainsi établi des modèles de souris qui expriment la luciférase sous le contrôle des œstrogènes (souris ERE-Luciférase) ou des récepteurs PPAR (PPRE-Luciférase). Ces souris permettent de détecter l'activité œstrogénique ou PPAR γ d'un composé dans tout l'organisme et ainsi de pouvoir mettre en évidence des molécules à activité dépendante du contexte de l'organe ou du tissu (SERM ou SPPARM). De nouveaux modèles issus de croisements entre différentes lignées de souris s'avèrent également très prometteurs pour le futur. Ainsi la souris TRAMP-Luc est issue d'un croisement entre une souris TRAMP (qui développe spontanément un cancer de la prostate et une souris PSA-luc qui exprime la luciférase sous le contrôle du promoteur de la protéine PSA dans la prostate). De tels modèles permettent de mesurer plus facilement l'effet d'une molécule chimique ou d'un cocktail de molécules sur une réponse complexe comme la formation ou la progression de tumeurs.

Tissus stéroïdo-dépendants

Chez les mammifères, la croissance de tissus du tractus reproducteur est fréquemment utilisée pour identifier une activité de type perturbateur endocrinien. Ainsi, chez les rongeurs mâles, la distance anogénitale est un paramètre couramment décrit pour mesurer l'effet de l'exposition à une substance

à activité anti-androgénique. Cette distance présente un dimorphisme sexuel ; elle est environ deux fois plus grande chez le mâle que chez la femelle du fait de l'action de la DHT au cours du développement. Chez l'être humain, il a été montré que ce dimorphisme sexuel est conservé chez les enfants (Salazar-Martinez et coll., 2004). Ce paramètre peut donc servir à mesurer l'exposition à des anti-androgènes potentiels avant la naissance. Chez les rongeurs femelles, la croissance du tissu utérin d'animaux préalablement ovariectomisés est utilisée pour détecter des effets de type pro-œstrogéniques.

Bibliographie

DRAKE AJ, VAN DEN DRIESCHE S, SCOTT HM, HUTCHISON GR, SECKL JR, SHARPE RM. Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology* 2009, **150** : 5055-5064

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

HOWDESHELL KL, RIDER CV, WILSON VS, GRAY LE JR. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res* 2008, **108** : 168-76

LEGLER J, ZEINSTRA LM, SCHUITEMAKER F, LANSER PH, BOGERD J, et coll. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 2002, **36** : 4410-4415

LEHRAIKI A, RACINE C, KRUST A, HABERT R, LEVACHER C. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 372-382

MYLCHREEST E, SAR M, WALLACE DG, FOSTER PM. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002, **16** : 19-28

SALAZAR-MARTINEZ E, ROMANO-RIQUER P, YANEZ-MARQUEZ E, LONGNECKER MP, HERNANDEZ-AVILA M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health* 2004, **3** : 8

TONG SK, MOURIEC K, KUO MW, PELLEGRINI E, GUEGUEN MM, et coll. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 2009, **47** : 67-73

VANDENBERG LN, MAFFINI MV, WADIA PR, SONNENSCHEIN C, RUBIN BS, SOTO AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 2007, **148** : 116-127

19
Méthodes d'études *in silico*

Le développement d'outils informatiques fiables couplé à la croissance de la puissance informatique a permis la mise en place de techniques de simulation numérique centrées sur la biologie. Par analogie avec les expressions *in vivo* et *in vitro*, le terme « *in silico* » a été introduit pour qualifier les méthodes numériques mises en œuvre pour traiter de tels systèmes. De par son nom, ce terme fait référence au silicium, matériau principal retrouvé dans les puces informatiques de tous les ordinateurs. Le champ *in silico* regroupe un très large ensemble de méthodes numériques fondées sur les lois de la physique et de la chimie qui, utilisant les approches des mathématiques, permettent de simuler ou de modéliser un phénomène biologique à l'aide de l'outil informatique. Dans le cadre de cette expertise, deux grandes familles de méthodes seront définies. La première, plus communément connue sous l'acronyme anglais QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) se base sur les relations quantitatives entre structures et propriétés, tandis que la seconde se réfère directement aux propriétés atomistiques de l'entité étudiée. Ces deux familles de méthodes brièvement décrites par la suite sont fréquemment employées dans les études des interactions comme celles rencontrées entre les perturbateurs endocriniens et leurs récepteurs.

Les méthodes *in silico* sont complémentaires des études *in vivo* et *in vitro* sur les perturbateurs endocriniens et ne peuvent remplacer l'expérience. Elles apportent des informations sur la nature des interactions chimiques entre les perturbateurs et les récepteurs et sont nécessaires à la bonne compréhension de ces mêmes mécanismes. Par la suite, de telles études peuvent être utilisées dans le développement de nouvelles expériences ou lors de la sélection de molécules à tester. En d'autres termes, l'utilisation combinée de la théorie et de l'expérience engendre une meilleure compréhension des phénomènes traités dans un domaine de recherche.

QSAR

Le principe des méthodes QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) consiste comme leurs noms l'indiquent à mettre en place une relation mathématique à l'aide de méthodes d'analyse de données, reliant des propriétés moléculaires microscopiques appelées descripteurs, à un effet expérimental (activité biologique, toxicité, affinité pour un récepteur), pour une série de

composés chimiques similaires. Le point de départ de telles méthodes se construit sur la définition des descripteurs moléculaires empiriques ou théoriques. Ces dernières prennent en compte des informations sur la structure et les caractéristiques physico-chimiques des molécules, comme dans ce cas présent, les perturbateurs endocriniens.

Les descripteurs théoriques se déclinent eux-mêmes en sous-classes de descripteurs : les constitutionnels, basés sur la composition chimique de la molécule, les topologiques, obtenus à partir de la structure bi-dimensionnelle (table de connectivité des atomes de la molécule), les géométriques, évalués à partir de la structure tri-dimensionnelle et les quantiques, issus de la structure électronique de la molécule. Les détails concernant les descripteurs quantiques sont disponibles dans l'ouvrage de Karelson (2010).

Le choix de la base de données expérimentales de référence est décisif dans une étude QSAR. Elle doit être composée de données expérimentales fiables obtenues en suivant un protocole expérimental unique. En effet, la robustesse du modèle dépend fortement de la base sur lequel il se fonde. Néanmoins, malgré tous les efforts mis en œuvre pour recueillir des données homogènes, une certaine incertitude ne peut être évitée, notamment pour les systèmes biologiques.

Enfin, le lien entre les descripteurs et la base de données est déterminé grâce à des outils d'analyse comme les régressions multi-linéaires (MLR), les régressions aux moindres carrés partiels (PLS), les arbres de décisions, les réseaux de neurones, et les algorithmes génétiques.

En pratique, le développement d'un modèle débute par la collecte de données expérimentales fiables et en nombre conséquent. Cette étape est suivie par le développement d'une série de descripteurs qui caractérisent les structures géométriques et électroniques des composés étudiés en vue de les relier à la propriété expérimentale étudiée. Des outils d'analyse de données sont alors employés pour orienter le choix des descripteurs adéquats et mettre en place le modèle à proprement dit.

Le modèle une fois développé, sa corrélation doit ensuite être validée sur le jeu d'entraînement. Sa robustesse, c'est-à-dire l'influence des composés du jeu d'entraînement sur le modèle, est estimée par des méthodes de validation interne. Afin d'estimer son pouvoir prédictif, des données expérimentales supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer la capacité du modèle à prédire ces valeurs. Enfin, il est important de savoir quel type de molécule s'utilise avec quel modèle. On parle alors de domaine d'applicabilité.

La relation QSAR mise en place peut alors être employée pour la prédiction de propriétés d'un jeu de nouvelles molécules existantes physiquement ou non, pour lesquelles les valeurs expérimentales ne sont pas disponibles. Une analyse fine des descripteurs intervenant dans le modèle QSAR donne également des informations sur la nature des mécanismes et des phénomènes

moléculaires (interactions électrostatiques ou hydrophobes) mis en jeu dans la propriété d'intérêt.

La littérature relate bon nombre d'études concernant les perturbateurs endocriniens, ainsi que les modèles robustes et fiables développés et validés sur de vastes ensembles de molécules. Dans la plupart des cas, les propriétés considérées sont relatives à des mesures *in vitro* comme l'affinité de liaison au récepteur, absolue (*binding affinity*, BA) ou relative au ligand naturel E2 (*relative binding affinity*, RBA). Les propriétés issues d'études *in vivo* ont rarement été considérées.

Méthodes de modélisation à l'échelle atomique

Si les modèles QSAR donnent des informations sur la nature des interactions entre ligands et récepteurs (électrostatiques ou hydrophobes), ils ne permettent pas de quantifier la force de liaison ni les atomes impliqués dans cette même liaison. Néanmoins, si la structure de la paire ligand/récepteur est connue (par exemple œstradiol/ER), des informations sur l'interaction peuvent être déduites par analogie. En outre, les méthodes de modélisation moléculaire permettent de déterminer la structure tri-dimensionnelle, l'énergie ainsi que d'autres propriétés chimico-physiques des molécules et des systèmes biologiques à partir de leur composition atomique.

Différentes approches de modélisation sont envisageables. Si celles concernant la mécanique moléculaire sont économiques en termes de temps de calcul et permettent de traiter des systèmes moléculaires de grande taille, les méthodes quantiques (*ab initio*, semi-empiriques, ou théorie de la fonctionnelle de la densité) sont quant à elles capables de calculer les propriétés électroniques des systèmes.

La mécanique moléculaire (MM) est fondée sur des calculs de mécanique classique qui permettent de calculer l'énergie stérique du système à partir des forces entre les atomes constituant la biomolécule. Les liaisons chimiques sont alors modélisées par des ressorts suivant l'approximation harmonique. Ces modèles sont paramétrés avec des données expérimentales (résolution de structure des protéines par les rayons X, spectre IR) ou théoriques. Malgré leur nature empirique, les approches de MM peuvent donner des informations précieuses sur la structure tri-dimensionnelle des récepteurs, sur leurs conformations et sur les interactions chimiques (électrostatiques, van der Waals, liaison hydrogène) avec le ligand. Si l'ensemble des paramètres constituants le modèle de MM (défini comme champs de force) est fiable, les résultats seront semi-quantitatifs.

La MM est à la base de méthodes de « *docking* » moléculaires, méthodes spécifiquement développées pour étudier les interactions entre une protéine et un substrat, ainsi qu'à la base de criblage *in silico*.

Les méthodes fondées sur la mécanique quantique (MQ) s'appuient sur la résolution approchée de l'équation de Schrödinger. Elles permettent la détermination de la configuration électronique de la molécule, sa structure tri-dimensionnelle, son énergie et ses propriétés chimico-physiques. Le plus souvent, ces propriétés comme par exemple, l'énergie d'interaction entre le substrat et le récepteur, sont déterminées de façon quantitative avec une précision qui avoisine celle de l'expérience. En revanche, les méthodes de MQ permettent seulement de traiter des systèmes dont la taille s'élève à la centaine d'atomes, taille approximative du site d'interaction avec le récepteur.

Le choix du type de calcul dépendra donc du problème étudié (taille et précision souhaitée pour le calcul) et évidemment des ressources de calcul (puissance de calcul) mises à disposition de l'utilisateur.

Dans les deux cas, que ce soit pour la MM ou la MQ, une structure tri-dimensionnelle du récepteur et du ligand est un pré-requis indispensable. Cette dernière peut être obtenue par la spectroscopie à rayon X, dans le cas où la cristallisation du récepteur est possible (structure en milieu solide, sans ou avec le substrat). De manière alternative, des indications sur la structure peuvent être données par la spectroscopie RMN (structure en solution) ou par modélisation par homologie. Ce dernier modèle implique la reconstruction de la structure tri-dimensionnelle à partir d'un alignement de séquence avec un autre système pour lequel la structure est connue. Les méthodes de MM permettent également d'identifier la structure tri-dimensionnelle d'une protéine à partir de la seule séquence en acides aminés, mais la présence de plusieurs conformations énergiquement stables peut compliquer la recherche.

Bibliographie

CRAMER CJ. Essentials of computational chemistry: theories and models. Wiley, 2e edition, 2004

DEVILLERS J, MARCHAND-GENESTE N, CARPY A, PORCHER JM. SAR and QSAR modeling of endocrine disruptors. *SAR and QSAR Environmental research* 2006, **17** : 393-412

GAO H, KATZENELLENBOGEN JA, GARG R, HANSCH C. Comparative QSAR analysis of estrogen receptor ligands. *Chem Rev* 1999, **99** : 723-744

JACOBS MN. In silico tools to aid risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Toxicology* 2004, **205** : 43-53

KARELSON M. Molecular Descriptors in Qsar/Qspr. John Wiley & Sons Inc, New York 2000

LEACH AR. Molecular modelling: principles and applications. Prentice Hall, 2e edition, 2001

LI J, GRAMATICA P. The importance of molecular structures, endpoints' values,and predictivity parameters in QSAR research: QSAR analysis of a series of estrogen receptor binders. *Mol Divers* 2010 **14** : 687-696

LIU H, PAPA E, GRAMATICA P. QSAR Prediction of estrogen activity for a large set of diverse chemicals under the guidance of OECD principles. *Chem Res Toxicol* 2006, **19** : 1540-1548

LIU H, PAPA E, WALKER JD, GRAMATICA P. In silico screening of estrogen-like chemicals based on different nonlinear classification models. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2007, **26** : 135-144

RONCAGLIONI A, BENFENATI E. In silico-aided prediction of biological properties of chemicals: oestrogen receptor-mediated effects. *Chem Soc Rev* 2008, **37** : 441-450

SHI LM, FANG H, TONG W, WU J, PERKINS R, et coll. QSAR Models using a large diverse set of estrogens *J Chem Inf Comput Sci* 2001, **41** : 186-195

TODESCHINI R, CONSONNI V. Handbook of molecular descriptors. In : MANNHOLD R, KUBINYI H, TIMMERMAN H (eds). WILEY VCH, Weinheim, 2000

ZHU BT, HAN GZ, SHIM JY, WEN Y, JIANG XR. Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor a and b subtypes: insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* **147** : 4132-4150

20
Approches « omiques »

L'idée de base associée aux approches « omiques » consiste à appréhender la complexité du vivant dans son ensemble, au moyen de méthodologies les moins restrictives possibles sur le plan descriptif. Ces approches peuvent en particulier être utiles pour mettre en évidence et identifier de nouveaux biomarqueurs (d'exposition, d'effet ou de susceptibilité), générer de nouvelles connaissances sur le plan mécanistique (modes d'action), ou encore élaborer de nouveaux outils de toxicologie prédictive pour aider à l'identification des dangers. Caractérisées comme des techniques à haut débit permettant une analyse simultanée d'un grand nombre de variables, elles comprennent principalement (figure 20.1) : la génomique (SNPs par exemple), la transcriptomique (expression des gènes et leur régulation), la protéomique (analyse des protéines), la métabolomique (étude des métabolites produits). Ces approches permettent d'obtenir de très nombreuses informations sur la réponse cellulaire et/ou tissulaire à une exposition *in vitro* ou *in vivo*.

Le développement des techniques à haut débit permettant ce type de profilage ou de « prise d'empreinte », ainsi que l'existence de techniques statistiques historiquement bien établies et maîtrisées laissant supposer une relative facilité de retraitement des données générées, font qu'aujourd'hui le nombre de chercheurs engagés dans cette voie est très important.

Si le passage de l'ère du tout génomique à l'ère de la protéomique a pris quelques dizaines d'années, le passage de la protéomique à la métabolomique n'a en effet pris que quelques années, puis l'apparition du concept de fluxomique[16] n'a ensuite pris que pratiquement quelques mois. Aujourd'hui, se développe un concept de « *Big Science* », reposant sur la génération et l'analyse d'un nombre de données jamais atteint auparavant, un des objectifs étant d'exploiter simultanément les données issues de ces différentes approches,

16. La fluxomique est la mesure des vitesses réelles des réactions métaboliques dans le système biologique intègre (flux intracellulaires, intratissulaires). Il n'existe pas de méthode directe permettant de mesurer des flux dans une cellule ou un tissu intègre. L'approche indirecte la plus pertinente est basée sur des stratégies de marquage isotopique (13C) couplées à l'analyse fine (mesure des « isotopomères ») de l'incorporation isotopique dans les métabolites, réalisée soit par spectrométrie de masse, soit par RMN. Elle aboutit à l'obtention de cartes de flux qui représentent la distribution quantitative des flux (ici carbonés) dans le réseau métabolique du système biologique étudié (http://metasys.insa-toulouse.fr/plateforme_metabolome/accueil.html)

comme autant d'angles de prise de vue complémentaires décrivant les systèmes biologiques étudiés. La difficulté réside néanmoins dans l'interprétation de ces nombreuses données nécessitant de faire appel à des moyens bioinformatiques puissants. La puissance de ces outils sur le plan descriptif permet aujourd'hui une caractérisation des systèmes biologiques à une échelle et une profondeur jamais atteintes. Ces technologies se heurtent toutefois à certaines limites sur le plan explicatif, la relation entre une signature moléculaire et la toxicité n'étant pas toujours évidente, de même que la validité aussi bien que l'interprétation biologique de biomarqueurs mis en évidence par ces nouveaux outils.

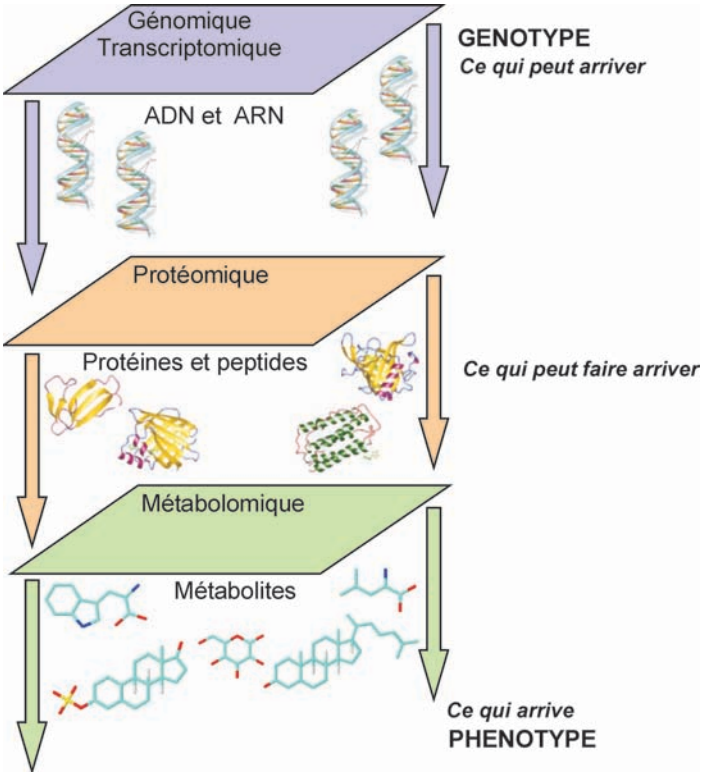


Figure 20.1 : Représentation schématique des trois grands niveaux de caractérisation des systèmes biologiques

Transcriptomique et protéomique

Depuis 2-3 ans, des approches globales d'analyse transcriptomique ont été réalisées à partir de différents organes (ovaires, testicules, utérus, glande mammaire, placenta) suite à des expositions *in utero* chez les rongeurs ou de

cultures cellulaires chez l'homme. Ces études, qui concernent le bisphénol A (Moral et coll., 2008 ; Lawson et coll., 2011) et les phtalates (Yuan et coll., 2010) mettent en évidence des modifications au niveau des grandes fonctions cellulaires, telles que la différenciation, le cycle cellulaire, ou les processus de biosynthèse des hormones stéroïdes. Il est difficile de dire si ces modifications sont des causes ou des conséquences des phénotypes observés et de faire des relations directes entre exposition et ces altérations transcriptionnelles mesurées souvent longtemps après l'exposition. Cependant, ces études sont des points de départ pour définir de nouveaux biomarqueurs d'exposition et avoir une vision globale de l'ensemble des mécanismes altérés au sein d'un tissu.

Des approches protéomiques ont également été récemment exploitées afin de caractériser une signature biologique caractéristique d'une exposition au bisphénol A chez le rongeur soit au niveau de la glande mammaire (Betancourt et coll., 2010), soit au niveau des organes impliqués dans l'immunité (Yang et coll., 2008). Ces études ont ainsi mis en évidence et identifié plusieurs protéines dont l'expression semble significativement affectée par le BPA, dont certaines impliquées dans la signalisation cellulaire. Deux études protéomiques ont également été conduites chez le poisson exposé à des contaminants perfluorés, au PFOA (Wei et coll., 2008) ou au PFOS (Shi et coll., 2009). Ces études ont montré l'existence d'une vingtaine de protéines (au niveau hépatique chez le vairon pour la première étude ou bien au niveau embryonnaire chez le zebrafish pour la seconde) dont l'abondance est significativement affectée par ces composés, ces protéines étant impliquées dans les voies physiologiques variées incluant le transport d'acides gras, le stress oxydatif, le maintien de l'homéostasie, le cycle cellulaire, ou encore les fonctions mitochondriales. Kling et coll. (2009) ont, quant à eux, réalisé une étude protéomique également chez le poisson (zebrafish) mais à partir de cultures cellulaires hépatiques exposées à des retardateurs de flamme polybromés (HBCD et/ou TBBPA), cette étude ayant là encore montré l'existence d'un profil protéique caractéristique de cette exposition, avec une partie distincte et une partie commune entre les deux substances testées. Cette étude a de plus souligné l'intérêt de cette approche pour mettre en évidence des effets de mélanges pas toujours prévisibles.

Métabolomique

Les approches de type métabolomique s'intéressent plus particulièrement aux composés chimiques présents au sein des systèmes biologiques étudiés, après la mise en jeu des phénomènes complexes de transcription et de traduction. Il s'agit donc globalement de molécules de faible poids moléculaire, le plus souvent inférieur à 1 000 Da, qui peuvent correspondre à des substances endogènes (métabolites primaires ou secondaires) ou exogènes. De façon conceptuelle (figure 20.2) et dans le domaine particulier de la toxicologie, le type de signature biologique au niveau du métabolome peut donc être considérée comme reflétant de façon concomitante une exposition chimique

(mesure des substances chimiques parentes ou de leurs produits directs de biotransformation/dégradation) et l'effet biologique induit par cette exposition (mesure de biomarqueurs indirects dont le niveau d'expression est sur- ou sous-exprimé consécutivement à cette exposition). Un des principaux avantages de ces approches est donc de caractériser de façon assez globale et non ciblée les perturbations biologiques liées à une exposition chimique donnée.

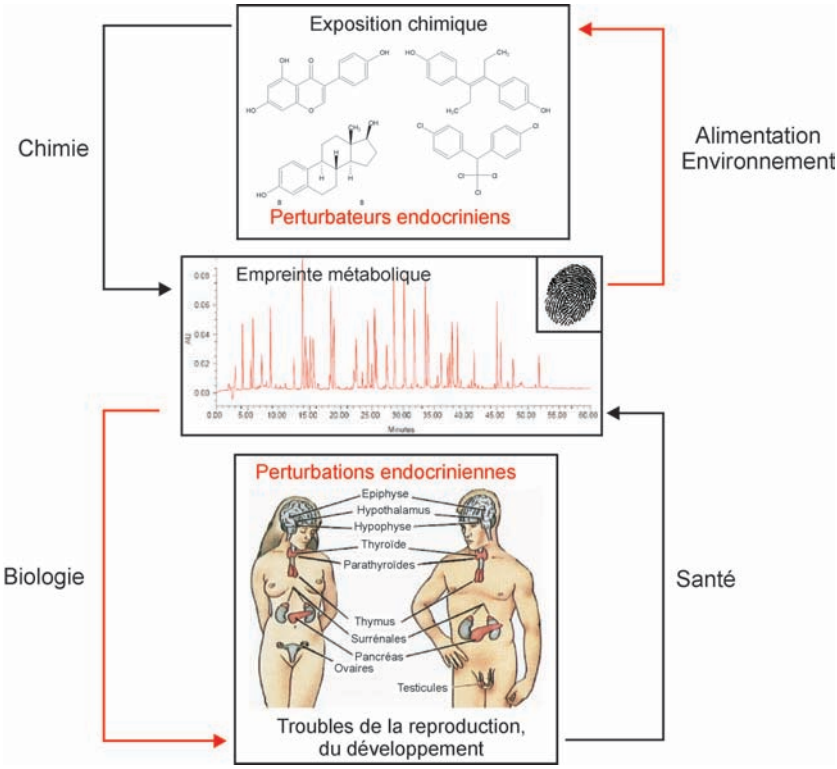


Figure 20.2 : Concept d'empreinte métabolique comme lien entre perturbateurs endocriniens et perturbation endocrinienne

Sur le plan technique, ce type de profilage métabolique a été historiquement proposé via la résonance magnétique nucléaire (RMN), notamment par l'équipe de Nicholson au Royaume-Uni (1999). Cette technologie est toujours le support de nombreuses applications en métabolomique, y compris dans le champ de la toxicologie et de la santé. La spectrométrie de masse (MS) représente une seconde approche de choix dans ce domaine.

Au-delà de ce concept relativement simple d'empreintes ou profils métaboliques, ce domaine requiert de façon pratique la mise en œuvre d'un cadre méthodologique dépassant largement l'étape de génération de ces profils proprement dite (Antignac et coll., 2011). Ainsi (figure 20.3), des procédures

doivent être développées et implémentées au niveau du traitement des échantillons biologique avant analyse, du retraitement des données brutes générées, de l'analyse statistique (notamment par des méthodes multivariées avancées), de l'extraction de l'information utile contenue dans ces empreintes sur la base d'un ensemble de critères complémentaires, de l'élucidation structurale des composés chimiques pouvant répondre au qualificatif de candidat biomarqueur, de la validation de ce caractère de biomarqueur, puis de l'interprétation biologique des perturbations métaboliques ainsi caractérisées.

Si ce schéma général (figure 20.3) représente une base globalement commune à l'ensemble des études métabolomiques, celles-ci peuvent avoir des finalités et par conséquent des spécificités dans leur mise en œuvre. Une première finalité de ces études peut être en effet la caractérisation exhaustive de l'ensemble des « métabolites » détectés (métabolomique systématique). Toutefois, ce travail se heurte généralement à la difficulté d'identification structurale non ambiguë des substances chimiques. Une seconde finalité plus couramment visée consiste à mettre en évidence parmi les descripteurs générés, un certain nombre d'entre eux dont le niveau d'expression est significativement différent (sur- ou sous-exprimé) entre deux ou plus sous-groupes d'échantillons donnés (métabolomique différentielle).

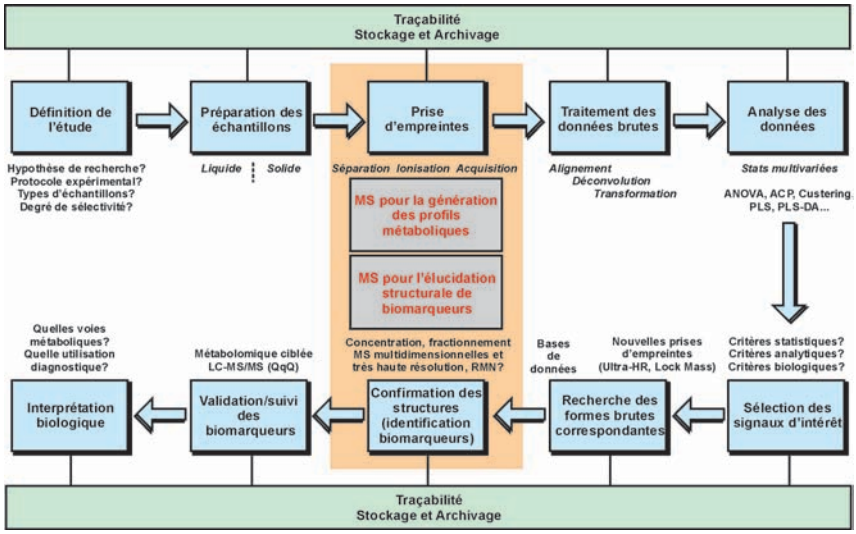


Figure 20.3 : Différentes étapes d'une approche métabolomique sur le plan expérimental

Exemple d'un support analytique de type spectrométrie de masse

Le concept de métabolomique trouve depuis quelques années un écho particulier dans le domaine de la toxicologie (Lindon et coll., 2005). Une première perspective est en effet la mise en évidence globale, bien au-delà du faible nombre de « *end-points* » usuellement étudiés, de l'impact de certaines

substances sur des systèmes biologiques donnés (Robertson et coll., 2000 ; Shockcor et coll., 2002 ; Griffin et coll., 2004 ; Ebbels et coll., 2007). Une seconde perspective est l'identification de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet permettant la génération de nouvelles connaissances s'agissant de leurs modes d'actions (Clarke et coll., 2008 ; Coen et coll., 2008 ; Coen, 2010 ; Beger et coll., 2010). Dans ce domaine, il est toutefois souvent difficile de distinguer les modifications métaboliques résultant d'une adaptation physiologique de celles signant une toxicité effective. Par ailleurs, la question de la représentativité de l'empreinte métabolomique générée (dépendante des différents niveaux de variabilité biologique et analytique) ou encore de son exhaustivité (dépendante de la technique de mesure), se pose clairement dans le cadre de ces approches et limite parfois la significativité des résultats obtenus et leur interprétation.

S'agissant des phtalates, une étude métabolomique conduite chez le rat Wistar (van Ravenzwaay et coll., 2009) s'est ainsi attachée à caractériser la signature plasmatique consécutive à une exposition aux phtalates (DEHP et/ou DBP). Cette étude a montré en particulier l'existence d'un niveau de concentration sans effet global au niveau du métabolome (150 mg/kg), et pour de plus fortes concentrations (1 000 à 3 000 mg/kg) une signature consécutive à une exposition en mélange significativement distincte de celle observée pour les deux composés testés considérés séparément. L'étude d'Eveillard et coll. (2009), également dédiée à l'étude de l'impact du DEHP au niveau hépatique chez la souris, a quant à elle illustré l'intégration possible de données transcriptomiques et métabolomiques issues d'un même système étudié. S'agissant des substances perfluorées (PFC) une étude métabolomique a été conduite chez le rat Sprague-Dawley pour caractériser la signature plasmatique d'une exposition au N-ethyl perfluorooctanesulfonamidoethanol (N-EtFOSE) (Xie et coll., 2009), révélant des marqueurs impliqués dans la prolifération de peroxysomes.

Deux autres études, non plus de type métabolomique au sens strict (c'est-à-dire global et non ciblé) mais de profilage métabolique, limitées à un ensemble de métabolites du même type détectés de façon ciblée, ont également été conduites pour étudier l'impact d'une exposition au bisphénol A sur les nucléosides urinaires chez le rat (Cho et coll., 2009) ou l'impact d'une exposition au DEHP sur les principaux lipides dans le tissus cérébral d'embryons de rat (Xu et coll., 2007).

Au-delà de ces premières études, la métabolomique reste aujourd'hui un domaine en développement, sur le plan des concepts comme sur le plan des outils et procédures, et ne permet pas encore d'appréhender la complexité de la relation entre exposition chimique (dans les conditions réelle de basses concentrations et de multi-exposition) et troubles de la reproduction (à l'échelle individuelle ou épidémiologique) telle que décrite à la figure 20.2. Des travaux sont toutefois en cours dans ce sens (Antignac et coll., communication personnelle), s'attachant à établir chez l'Homme un lien (au mieux

de corrélation) entre d'une part un profil d'imprégnation chimique le plus large possible (mesure quantitative et ciblée d'un grand nombre de substances incluant différentes classes de contaminants chimiques), d'autre part une empreinte métabolomique globale (par exemple dans le plasma ou sérum), et enfin des paramètres cliniques indicateurs de fonctions de la reproduction ou du développement (par exemple de la qualité spermatique chez l'homme).

Bibliographie

ANTIGNAC JP, COURANT F, PINEL G, MONTEAU F, LE BIZEC B. Mass spectrometric based metabolomic in the field of chemical risk: state of the art, pitfalls, and future trends. *TrAC Trends in Anal Chem* 2011, in press (doi: 10.1016/j.trac.2010.11.003)

BEGER RD, SUN J, SCHNACKENBERG LK, Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, **243** : 154-166

BETANCOURT AM, MOBLEY JA, RUSSO J, LAMARTINIERE C. A. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. *J Proteomics* 2010, **73** : 1241-1253

CHO SH, CHOI MH, KWON OS, LEE WY, CHUNG BC. Metabolic significance of bisphenol A-induced oxidative stress in rat urine measured by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Appl Toxicol* 2009, **29** : 110-117

CLARKE CJ, HASELDEN JN. Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol* 2008, **36** : 140-147

COEN M. A metabonomic approach for mechanistic exploration of pre-clinical toxicology. *Toxicology* 2010, **278** : 326-340

COEN M, HOLMES E, LINDON JC, NICHOLSON JK. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008, **21** : 9-27

EBBELS TM, KEUN HC, BECKONERT OP, BOLLARD ME, LINDON JC, et coll. Prediction and classification of drug toxicity using probabilistic modeling of temporal metabolic data: the consortium on metabonomic toxicology screening approach. *J Proteome Res* 2007, **6** : 4407-4422

EVEILLARD A, LASSERRE F, DE TAYRAC M, POLIZZI A, CLAUS S, et coll. Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, **236** : 282-292

GRIFFIN JL, BOLLARD ME, Metabonomics: its potential as a tool in toxicology for safety assessment and data integration. *Curr Drug Metab* 2004, **5** : 389-398

KLING P, FORLIN L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, **72** : 1985-1993

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

LINDON JC, KEUN HC, EBBELS TM, PEARCE JM, HOLMES E, NICHOLSON JK, The Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics* 2005, **6** : 691-699

MORAL R, WANG R, RUSSO IH, LAMARTINIERE CA, PEREIRA J, RUSSO J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol* 2008, **196** : 101-112

NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. Metabonomics : understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999, **29** : 1181-1189

ROBERTSON DG, REILY MD, SIGLER RE, WELLS DF, PATERSON DA, BRADEN TK, Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants. *Toxicol Sci* 2000, **57** : 326-337

SHI X, YEUNG LW, LAM PK, WU RS, ZHOU B. Protein profiles in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 2009, **110** : 334-340

SHOCKCOR JP, HOLMES E, Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis. *Curr Top Med Chem* 2002, **2** : 35-51

VAN RAVENZWAAY B, COELHO-PALERMO CUNHA G, STRAUSS V, WIEMER J, LEIBOLD E, et coll. The individual and combined metabolite profiles (metabolomics) of dibutylphthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate following a 28-day dietary exposure in rats. *Toxicol Lett* 2010, **198** : 159-170

WEI Y, CHAN LL, WANG D, ZHANG H, WANG J, DAI J. Proteomic analysis of hepatic protein profiles in rare minnow (Gobiocypris rarus) exposed to perfluorooctanoic acid. *J Proteome Res* 2008, **7** : 1729-1739

XIE W, WU Q, KANIA-KORWEL I, THARAPPEL JC, TELU S, et coll. Subacute exposure to N-ethyl perfluorooctanesulfonamidoethanol results in the formation of perfluorooctanesulfonate and alters superoxide dismutase activity in female rats. *Arch Toxicol* 2009, **83** : 909-924

XU Y, AGRAWAL S, COOK TJ, KNIPP GT. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure. *Arch Toxicol* 2007, **81** : 57-62

YANG M, LEE HS, PYO, MY. Proteomic biomarkers for prenatal bisphenol A-exposure in mouse immune organs. *Environ Mol Mutagen* 2008, **49** : 368-373

YUAN X, JONKER MJ, DE WILDE J, VERHOEF A, WITTINK FR, et coll. Finding maximal transcriptome differences between reprotoxic and non-reprotoxic phthalate responses in rat testis. *J Appl Toxicol* 2010, doi: 10.1002/jat.1601. (Epub ahead of print)

21
Méthodes d'étude épidémiologique

La principale distinction entre les méthodes d'études *in vitro* et *in vivo* et les méthodes d'étude épidémiologique réside dans sa nature observationnelle, par opposition au caractère expérimental de la toxicologie. La nature observationnelle de l'épidémiologie implique que l'exposition n'est pas randomisée (attribuée aléatoirement à chaque sujet), mais qu'elle est constatée, et est le fait de sa situation personnelle (lieu de vie, comportements, caractéristiques sociodémographiques). La conséquence est que la répartition des facteurs de risque de la maladie (autres que l'exposition considérée) peut différer entre les groupes de sujets comparés, ce qui peut entraîner ce que les épidémiologistes appellent un biais de confusion (voir plus bas).

Principales approches de l'épidémiologie environnementale

Les deux principaux types d'études épidémiologiques en population à visée étiologique (c'est-à-dire visant à identifier les facteurs de risque des événements de santé) sont l'étude de cohorte et l'étude cas-témoins. À cela il faut ajouter d'autres approches, moins fréquemment utilisées, telles que les approches écologiques ou celles reposant sur des séries de cas, et deux approches n'impliquant pas de recrutement de sujets mais s'appuyant sur des données déjà disponibles : la méta-analyse et l'étude de risque sanitaire.

Étude de cohorte

L'approche de cohorte consiste à recruter des sujets indemnes de la pathologie d'intérêt et de les suivre au cours du temps pour identifier au niveau individuel la survenue de cette pathologie. Généralement, l'exposition au facteur environnemental considéré est estimée lors de l'inclusion dans la cohorte, cette mesure pouvant être actualisée au cours du suivi. On peut en pratique recruter plusieurs cohortes suivies en parallèle, définies par exemple par leur niveau d'exposition : une cohorte de travailleurs exposés à un composé chimique donné, et une cohorte « non exposée » d'employés de la même entreprise mais ne travaillant pas à des postes exposés. Souvent, une unique cohorte est recrutée, incluant des sujets exposés à des niveaux divers.

Au cours du suivi, en plus d'une mesure (ou estimation) de l'exposition au(x) facteur(s) environnemental(taux) d'intérêt, des informations sur les facteurs de confusion potentiels sont recueillies ; diverses mesures de paramètres biologiques (marqueurs d'inflammation, polymorphismes génétiques...) peuvent aussi être réalisées.

L'analyse statistique consiste à comparer la fréquence de survenue de la maladie entre les différents groupes définis par leur niveau d'exposition, en corrigeant les différences de fréquence de la maladie qui seraient dues aux facteurs de confusion (figure 21.1). Cette analyse peut permettre d'étudier et de prendre en compte des facteurs modifiant l'effet éventuel des perturbateurs endocriniens, tels que des caractéristiques génétiques (Cantor et coll., 2010) ou sociodémographiques.

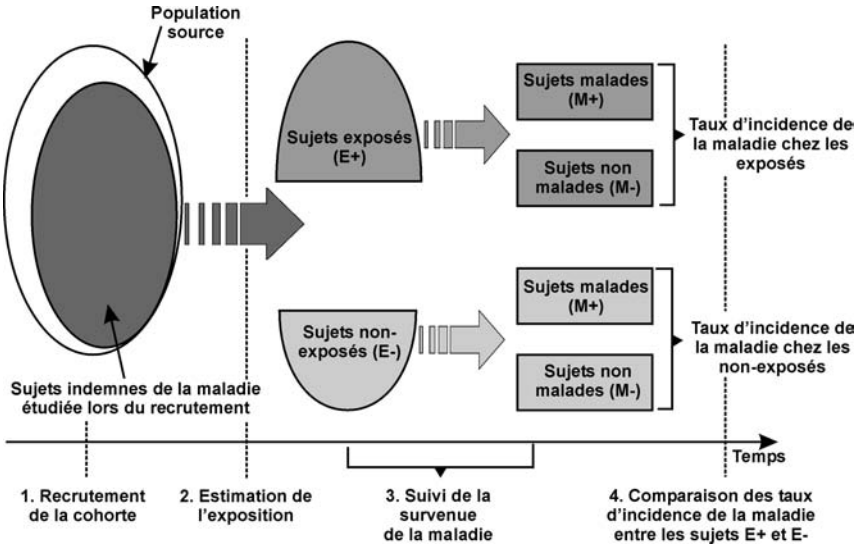


Figure 21.1 : Principe de l'étude de cohorte prospective

Du point de vue de l'épidémiologiste, l'approche toxicologique classique consistant à exposer des groupes d'animaux exposés à différents niveaux d'un composé ou d'un mélange de composés chimiques et à suivre la fréquence d'apparition de certains troubles de la santé (ou de suivre les variations de paramètres biologiques) au cours du temps pour la mettre en relation avec le niveau d'exposition au composé considéré correspond à une étude de cohorte dans laquelle l'exposition aurait été attribuée aléatoirement aux animaux.

Étude cas-témoins

L'étude cas-témoins consiste à recruter d'une part des personnes présentant l'événement de santé d'intérêt, et d'autre part un groupe de personnes comparables mais ne présentant pas l'événement de santé (ou témoins). L'exposition

aux facteurs environnementaux considérés, ainsi que le niveau des facteurs de confusion potentiels, sont estimés chez chacun des sujets.

Si l'étude cas-témoins est réalisée sur les cas incidents (ceux survenant dans une zone ou un lieu de recrutement donné dans une période donnée), l'étude cas-témoins est en principe équivalente à une étude de cohorte réalisée à partir de la même population source (les habitants de la zone considérée ou les patients susceptibles d'aller consulter sur le lieu de recrutement choisi), mais dans laquelle on ne recruterait les sujets que lorsqu'un cas survient, et non pas avant la survenue de la maladie. Au lieu de suivre tous les sujets qui ne développeront pas la maladie dans la population source, on ne suit qu'un sous-groupe aléatoire de ceux-ci, beaucoup plus petit, recruté par exemple à raison de quelques témoins juste après la survenue de chaque nouveau cas. L'*odds-ratio* de maladie estimé par cette étude cas-témoins aura la même interprétation que le risque relatif instantané (*hazard ratio* en anglais) qui aurait été estimé à partir de l'ensemble de la cohorte.

Le critère de choix des témoins est crucial pour la validité de l'étude. En principe, ceux-ci ne doivent pas forcément être représentatifs de la population générale dans son ensemble, mais ils doivent être représentatifs des sujets qui, s'ils développaient la maladie, seraient recrutés comme cas. Si par exemple les cas correspondent aux sujets chez qui un cancer du sein a été diagnostiqué en 2010 dans un service hospitalier donné, les témoins doivent correspondre à un échantillon aléatoire des femmes qui, si elles développaient la maladie, seraient diagnostiquées dans ce même service. On peut envisager de recruter ces témoins dans d'autres services du même hôpital, à condition que ces services aient la même zone de recrutement (et le même bassin sociodémographique) que le service où sont recrutés les cas.

Une étude cas-témoins est par définition rétrospective : le recrutement s'effectue après la survenue de la maladie. Ceci peut poser un problème dans le cas où l'exposition au facteur environnemental d'intérêt est difficile à estimer rétrospectivement, comme c'est typiquement le cas pour les perturbateurs endocriniens. Dans ce cas, d'importantes erreurs de classement sur l'exposition sont attendues, qui pourront biaiser l'association estimée entre exposition et survenue de la maladie (voir plus bas, estimation des expositions). Une exception notable correspond à l'étude cas-témoins nichée dans une cohorte (voir ci-dessous).

Cohorte ou cas-témoins ?

En principe, l'approche de cohorte (idéalement, avec une randomisation de l'exposition, rarement possible pour des raisons éthiques si l'exposition est potentiellement néfaste) est considérée comme l'approche reine. C'est elle qui, par sa nature prospective, permet d'aller vers une mesure de chaque facteur dans la période pertinente, de façon prospective, et, en reconstituant précisément la chronologie des expositions et événements de santé, d'éviter

les biais de causalité inverse. Toutefois cette approche peut dans certains cas se révéler très lente et coûteuse à réaliser, et, dans certaines situations, l'étude cas-témoins apportera en un temps et pour un coût plus limités une information de qualité quasi équivalente.

Si on ne peut donner de règles générales quant à l'utilisation d'un *design* d'étude dans une situation particulière, il existe des situations typiques dans lesquelles chaque approche va se révéler plus pertinente : si le taux d'incidence de la maladie est élevé, si le délai de latence supposé entre le moment de l'exposition et celui de la survenue de la maladie est relativement court (de quelques semaines à quelques mois, voire un petit nombre d'années), une approche de cohorte peut se révéler relativement peu coûteuse et mérite d'être considérée. Si la maladie est rare, une étude cas-témoins peut se révéler judicieuse. Dans le cas du cancer du testicule, dont l'incidence chez l'homme adulte est de l'ordre de 10 cas pour 100 000 personnes-années, il faut suivre 100 000 hommes pendant 10 ans pour recruter 100 cas. Une étude cas-témoins à partir des cas diagnostiqués dans plusieurs grands centres hospitaliers pourra en un à deux ans recruter ces cas, et environ 300 témoins, et fournir une information similaire (mais peut-être davantage de biais) dans un délai bien plus bref et avec un effectif total de 400 sujets. Toutefois, cette approche cas-témoins risque de ne pas être pertinente si l'exposition au facteur environnemental considéré ne peut être estimée que par le dosage d'un biomarqueur peu persistant dans l'organisme. Dans ce cas, le dosage réalisé au moment du diagnostic du cas a peu de chances de fournir une bonne estimation de l'exposition dans la fenêtre temporelle biologiquement pertinente, plusieurs années auparavant. Dans le cas où on s'intéresse aux effets à long terme des expositions subies durant la vie intra-utérine, expositions souvent très difficiles à estimer rétrospectivement, il y a peu d'alternatives pertinentes à la mise en place d'une cohorte de femmes enceintes, chez qui différents prélèvements biologiques sont réalisés, avec un suivi à long terme de leurs enfants. De telles cohortes ont été mises en place dans différents pays, par exemple la cohorte Moba en Norvège (incluant environ 100 000 enfants), la *Danish National Birth Cohort* (environ 90 000 enfants) ou, en France, les cohortes Pélagie (3 500 enfants bretons) ou Eden (1 900 enfants nés à Nancy et Poitiers).

Cohorte et cas-témoins

Dans le cas particulier d'une étude cas-témoins nichée dans une cohorte, les cas et les témoins sont recrutés à partir d'une unique cohorte (en général, en recrutant tous les cas de la pathologie d'intérêt déclarés dans la cohorte, et un sous-groupe des sujets n'ayant pas développé la maladie). L'intérêt de l'approche est que les informations sur les caractéristiques des sujets et leur niveau d'exposition ont généralement été recueillies lors du recrutement dans la cohorte, c'est-à-dire avant la survenue de la maladie (prospectivement). En particulier, si des prélèvements biologiques ont été réalisés à l'inclusion dans

la cohorte et congelés, ceux-ci peuvent être utilisés après la survenue des cas pour doser un biomarqueur d'exposition. Si la maladie est rare, le coût total est bien plus faible que si les dosages avaient été réalisés sur l'ensemble de la cohorte.

Méta-analyse

La méta-analyse consiste à synthétiser les résultats de plusieurs études sur un sujet donné pour obtenir une estimation plus précise et fiable de l'effet du facteur considéré sur le risque de maladie (figure 21.2). L'unité d'analyse n'est donc plus le sujet ou le patient, mais une étude elle-même. Cette approche peut permettre de discuter l'homogénéité des études sur un sujet donné, et peut s'avérer particulièrement utile pour des maladies ou des facteurs d'exposition rares, pour lesquels chaque étude individuelle risque d'être peu informative. C'est une forme standardisée de synthèse de la littérature scientifique sur un sujet, qui est plus formalisée que la simple revue de la littérature. Sur le principe, l'*odds-ratio* issu de la méta-analyse peut être interprété comme une moyenne pondérée des *odds-ratios* issus de chaque étude individuelle, le poids donné à chaque étude dépendant de sa précision.

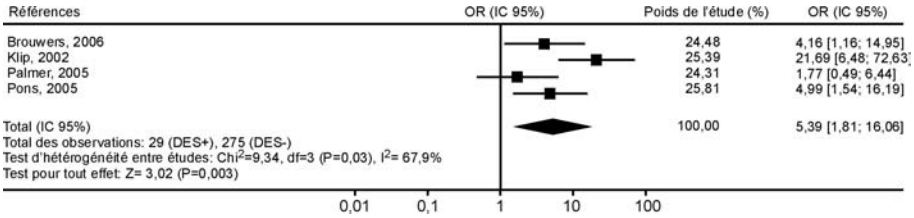


Figure 21.2 : Exemple de méta-analyse, reprenant les résultats des études concernant l'association entre l'exposition féminine au distilbène (DES) durant la vie intra-utérine et le risque de survenue d'hypospadias dans la descendance

Le losange noir indique la valeur de l'*odds-ratio* méta-analytique et ses extrémités gauche et droite indiquent les limites de l'intervalle de confiance à 95% de cet OR méta-analytique (d'après Slama et Cordier 2010).

Étude d'impact sanitaire

L'étude d'impact sanitaire vise à quantifier l'impact sanitaire d'un facteur donné, à l'échelle d'une communauté. Elle consiste, connaissant les niveaux d'exposition dans la communauté et l'effet de l'exposition sur le risque de maladie au niveau individuel (relation dose-réponse estimée à partir d'études épidémiologiques par exemple), à quantifier le risque de maladie, c'est-à-dire le nombre de cas de la maladie attribuables (attendus) du fait de l'installation industrielle ou du facteur considéré. Une telle étude n'implique pas de mesurer directement la fréquence des maladies dans la communauté concernée,

comme on le ferait dans une étude épidémiologique de cohorte ou de type cas-témoins, ni de suivre à long terme d'importantes populations.

Par exemple, une étude d'impact sanitaire a estimé en 2001 que la pollution atmosphérique liée au trafic routier était susceptible d'entraîner environ 18 000 décès par an chez les adultes de plus de 30 ans en France (intervalle de confiance à 95 %, de 10 700 à 24 700 décès). Cette étude (Kunzli et coll., 2000) a été réalisée en estimant la distribution des niveaux d'exposition aux polluants atmosphériques de la population française, et en appliquant des modèles mathématiques (relations dose-effet) obtenus à partir de plus petites populations et quantifiant le nombre de décès attendus dans chaque groupe en fonction de son niveau d'exposition.

Étude transversale

Si l'échantillonnage transversal correspond bien à un mode d'échantillonnage classique utilisé en théorie des sondages, en épidémiologie descriptive ou en science des expositions pour décrire la prévalence d'une pathologie, d'un critère biologique (études de séroprévalence par exemple) ou d'une exposition dans une population à un moment donné, il n'y a pas au sens strict d'étude étiologique transversale. En revanche, des analyses statistiques sont fréquemment réalisées à partir d'échantillons transversaux de population chez qui la présence d'un événement de santé est recherchée et l'exposition à un facteur environnemental estimé. Ceci peut être vu comme une version dégradée de l'étude de cohorte, avec un recueil simultané de l'information sur l'exposition et l'événement de santé (alors que dans une cohorte, l'information sur l'exposition est normalement recueillie avant celle sur les paramètres de santé d'intérêt), et une analyse portant sur les cas prévalents de la maladie plutôt que sur les cas incidents. Dans le cas de facteurs environnementaux dont l'exposition est estimée à partir de biomarqueurs peu persistants dans l'organisme (comme c'est le cas pour certains perturbateurs endocriniens, comme le bisphénol A), cette approche est notamment limitée, tout comme l'approche cas-témoins, car elle ne permet pas d'estimer directement l'exposition dans la fenêtre biologiquement pertinente, qui peut remonter à plusieurs années avant la survenue du cas dans le cas d'événements de santé pour lesquels une programmation à long terme est probable. Une étude réalisée dans le Massachusetts fournit un exemple de cette approche : à partir d'un échantillon transversal d'hommes consultant dans une clinique d'infertilité, des échantillons de sperme et d'urine ont été recueillis le même jour. L'échantillon d'urine a permis de doser la concentration de bisphénol A, qui a été mise en relation avec la concentration spermatique, en faisant l'hypothèse que la concentration urinaire de bisphénol A pouvait être considérée comme un bon marqueur du niveau moyen de bisphénol A dans les mois précédents (Meeker et coll., 2010).

Autres types d'études épidémiologiques

D'autres approches sont utilisées en épidémiologie environnementale. Il s'agit en particulier des approches écologiques : de type temporel, correspondant à l'approche des séries temporelles (Bell et coll., 2004), ou spatial, dans lesquelles l'unité d'observation est la population dans son ensemble et non pas l'individu, des approches *case-crossover* (Maclure 1991). Ces approches n'ayant pour l'instant pas été appliquées à des polluants tels que les perturbateurs endocriniens ne seront pas détaillées ici.

Estimation des expositions en épidémiologie environnementale

On peut considérer que c'est à la suite d'une chaîne d'événements plus ou moins complexes selon les polluants que ceux-ci finissent par arriver en contact avec l'Homme (figure 21.3) : émission du ou des polluants à partir de certaines sources (d'origine anthropique ou naturelle), dispersion/répartition dans les différents grands compartiments de l'environnement (eau, air, sol, chaîne alimentaire, médicaments, habitat...), où les polluants sont transférés et parfois transformés, pour arriver jusqu'aux micro-environnements en contact direct avec l'Homme ; internalisation d'une partie des polluants dans l'organisme (par inhalation, ingestion, absorption dermique, irradiation...), métabolisme (figure 21.3), stockage/excrétion. Les grandeurs correspondant à chacune de ces étapes sont différentes : les polluants émis dans l'environnement correspondent à une quantité (totale ou par unité de temps) ; les niveaux mesurés dans l'environnement à une concentration (par volume d'air, d'eau ou unité de masse végétale ou animale) ; l'exposition humaine, qui correspond au sens strict à la quantité du polluant qui a été en contact avec les surfaces d'échanges de l'organisme pendant une période donnée ; la dose (interne) correspond à la quantité de polluant qui a pénétré dans l'organisme (quantité ou concentration par litre de fluide biologique ou kg de tissu).

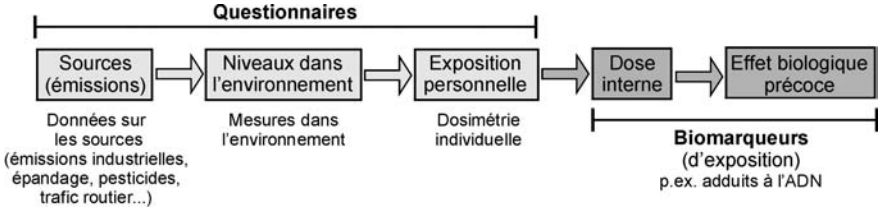


Figure 21.3 : Représentation des grandes familles d'approches utilisées en épidémiologie environnementale pour estimer l'exposition aux polluants environnementaux

Le type d'étude choisi ne détermine généralement pas de façon univoque l'approche pouvant être utilisée pour estimer l'exposition. Cette approche

pourra reposer, de façon non exclusive, sur des questionnaires (aux sujets de l'étude, leurs proches, leur personnel soignant…), des modèles environnementaux déjà disponibles, des mesures environnementales (par exemple à proximité des lieux de vie des sujets), des mesures d'exposition personnelle (à partir de dosimètres portés par les sujets dans une période définie), des dosages de biomarqueurs d'exposition à partir de prélèvements biologiques réalisés chez les sujets (sang, urine, lait…).

L'exposition est souvent résumée sous forme d'une quantité, mais il est crucial d'identifier aussi la fenêtre d'exposition considérée dans l'étude, c'est-à-dire la période temporelle (définie de façon calendaire, ou plus pertinemment par rapport à l'âge ou au stade de développement du sujet) au cours de laquelle cette exposition est quantifiée.

D'autres grandeurs liées à l'exposition peuvent être aussi considérées : débit de dose, caractère aigu ou chronique de l'exposition, dépassement d'un certain niveau d'exposition…

Biomarqueurs d'exposition

Dans le cas (très fréquent aujourd'hui) où des prélèvements biologiques sont réalisés, tous les outils de la biochimie et de la biologie moléculaire peuvent être utilisés si les conditions de prélèvement et de stockage le permettent. C'est le cas entre autres des outils de protéomique et de métabolomique. En complément de ces approches globales, une approche polluant par polluant est possible, et reste la plus fréquemment utilisée : dans ce cas, un composé ou un petit nombre de composés d'une même famille sont dosés simultanément (par exemple, le PFOA et le PFOS). Si l'effectif est suffisant, l'analyse statistique peut permettre de prendre en compte simultanément ces différents polluants afin de chercher à identifier leur effet propre. Par exemple, dans une étude concernant l'effet des perturbateurs endocriniens sur les caractéristiques spermatiques, les auteurs ont cherché à isoler l'association entre l'exposition aux parabènes avec les caractéristiques spermatiques de l'association entre l'exposition au bisphénol A avec les caractéristiques spermatiques (Meeker et coll., 2011).

La problématique des mélanges est parfois abordée sous un autre angle ; dans le cas d'une étude concernant l'impact de perturbateurs endocriniens sur le risque de cancer du sein, un indice global du fardeau de xéno-œstrogènes dans l'organisme a été estimé à partir de prélèvements de tissu adipeux et son association avec le risque de cancer du sein quantifiée (Fernandez et coll., 2004 ; Ibarluzea et coll., 2004).

Si l'approche par biomarqueur d'exposition peut sembler séduisante au premier abord car elle fait la jonction entre l'épidémiologie et les outils de la biologie moléculaire et de la biochimie, et également par son caractère objectif, elle peut se révéler très limitée dans différentes situations : c'est en particulier le cas

quand on connaît mal le métabolisme chez l'humain des composés étudiés (auquel cas ses principaux métabolites peuvent ne pas être connus), quand le métabolisme varie fortement avec la dose, et quand le composé parent et ses principaux métabolites ont une demi-vie très courte (typiquement, quelques heures) dans l'organisme. Dans ce dernier cas (figure 21.4), il est peu probable qu'un unique prélèvement biologique suffise à donner une bonne estimation de l'imprégnation ou même de la hiérarchie des sujets en termes d'imprégnation, et d'autant moins que la fenêtre d'exposition biologiquement pertinente est longue. Une alternative consiste à recueillir plusieurs échantillons biologiques répartis durant l'ensemble de la fenêtre d'exposition biologiquement pertinente, ce qui peut se révéler logistiquement ou éthiquement difficile à grande échelle, ou dans le cas de prélèvements invasifs.

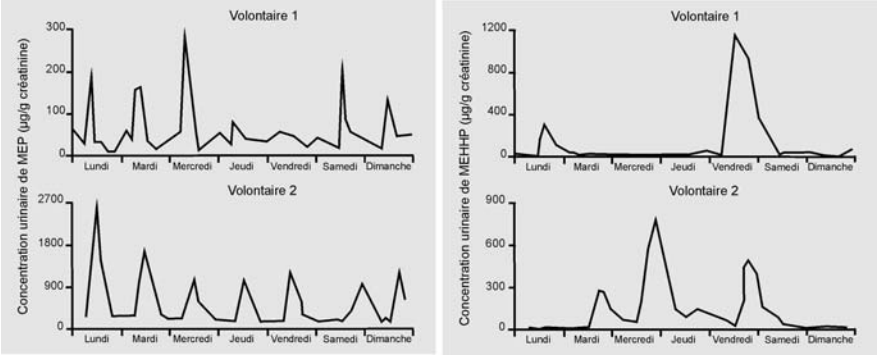


Figure 21.4 : Variations de la concentration urinaire de deux métabolites de phtalates au cours de la semaine chez des volontaires sains (d'après Preau et coll., 2011)

Chaque figure correspond au profil du métabolite concerné au cours de la semaine chez un volontaire en situation d'exposition « normale ».

Erreur et biais

Les 4 grandes sources d'erreur en épidémiologie sont l'erreur aléatoire, les biais de confusion, les biais de classement et les biais de sélection. La notion d'erreur indique un écart entre la « vraie » valeur (par exemple le poids de naissance) et la valeur estimée (le poids de naissance mesuré par la sage-femme avec une balance donnée). Si cette erreur a une composante systématique, c'est-à-dire si la valeur estimée sur un grand nombre d'estimations de la valeur d'intérêt diffère de la valeur réelle (comme cela se produirait si la balance était faussée et avait tendance par exemple à sous-estimer de 100 g la masse réelle), on parle d'erreur systématique ou de biais. Si la moyenne des valeurs estimée correspond à la valeur réelle (comme cela surviendrait si la balance avait tendance alternativement à sous-estimer puis à surestimer de 100 g la masse réelle), on parle d'erreur aléatoire et non pas de biais.

Erreur aléatoire

C'est la composante non systématique (c'est-à-dire sans direction privilégiée, ou nulle en moyenne) de l'erreur. Dans une vision déterministe, l'erreur aléatoire est due en partie à notre méconnaissance des facteurs influençant la survenue de l'événement d'intérêt : plus on diminue cette méconnaissance, plus les variations aléatoires s'amenuisent.

Une autre composante de l'erreur aléatoire est due aux fluctuations d'échantillonnage (ou erreur d'échantillonnage). Augmenter la taille de l'échantillon d'étude (sans que cela se fasse au détriment de la précision et la validité des mesures faites sur les sujets) permet de limiter les fluctuations d'échantillonnage et donc l'erreur aléatoire.

Biais de confusion

On parle de biais de confusion quand il existe un facteur extérieur à la chaîne causale reliant l'exposition à la maladie considérée qui fausse l'estimation de l'association entre exposition et maladie. Ceci peut typiquement survenir si ce facteur extérieur est à la fois associé à l'exposition et à la probabilité de survenue de la maladie (sans en être une cause). Si par exemple on s'intéresse à l'effet possible de l'exposition intra-utérine au bisphénol A provenant du régime alimentaire maternel sur la fertilité à l'âge adulte, le tabagisme maternel pendant la grossesse est susceptible de constituer un facteur de confusion (figure 21.5) : il peut être associé au régime alimentaire, et donc à l'exposition intra-utérine au bisphénol A. D'autre part, il est susceptible d'influencer la fertilité de la descendance à l'âge adulte (Jensen et coll., 2005).

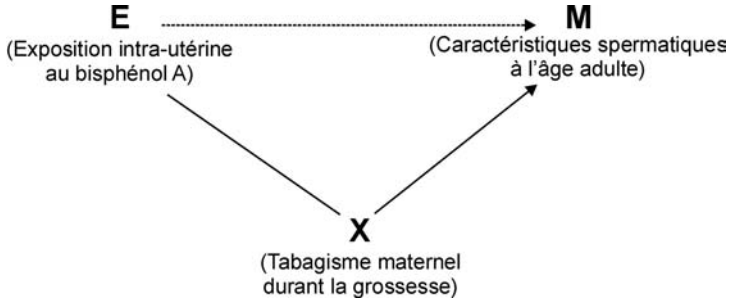


Figure 21.5 : Facteur de confusion : diagramme causal d'une étude hypothétique visant à caractériser l'impact de l'exposition intra-utérine au bisphénol A sur les caractéristiques spermatiques à l'âge adulte

S'il est associé au régime alimentaire maternel (influençant l'exposition au bisphénol A du fœtus) et à la fertilité à l'âge adulte, le tabagisme maternel pendant la grossesse est un facteur de confusion potentiel.

Les biais de confusion dus à des facteurs connus peuvent être corrigés par différentes approches. La plus fréquemment utilisée est de nature statistique et

consiste à mesurer le facteur correspondant et à le prendre en compte par ajustement dans le modèle de régression estimant l'association entre exposition et maladie. L'association ainsi estimée sera équivalente à celle qu'on aurait observée si la fréquence du facteur d'exposition était la même entre le groupe exposé et le groupe non exposé, c'est-à-dire si on avait supprimé l'association entre l'exposition et le facteur de confusion.

Biais de classement

La réalisation d'une étude épidémiologique peut être vue comme un exercice de métrologie, dans lequel on mesure (ou estime) chez des sujets recrutés selon un protocole défini et validé un niveau d'exposition, la survenue d'un événement de santé, et la présence de facteurs de confusion potentiels. Pour des raisons logistiques et aussi liées à la complexité des paramètres étudiés, chacune de ces mesures est susceptible de se faire avec une certaine erreur.

L'existence de ces erreurs de mesure (ou de classement) n'entraîne pas automatiquement de biais et n'invalide donc pas forcément l'étude. En particulier, si l'erreur de mesure sur un facteur donné (par exemple, l'exposition à un composé perfluoré estimée à partir de dosages plasmatiques réalisés dans une fenêtre biologiquement pertinente par rapport à l'événement de santé étudié) est totalement aléatoire, c'est-à-dire indépendante de toutes les caractéristiques des sujets y compris de leur exposition réelle, cette erreur aura pour principale conséquence de diminuer la précision de l'association estimée entre exposition et maladie. Il n'est pas sûr qu'un biais survienne, mais s'il y en a un celui-ci correspondra généralement à une sous-estimation de l'association entre exposition et maladie. En d'autres termes, l'intervalle de confiance associé au risque relatif quantifiant cette exposition sera plus large que si l'exposition avait été mesurée sans erreur, et la puissance statistique de l'étude sera diminuée. Le tableau 21.I indique par exemple que si l'exposition estimée est corrélée à l'exposition réelle avec un coefficient de corrélation de 0,6 et que l'effet de l'exposition réelle correspond à un risque relatif de 3, il faudra recruter 2 à 3 fois plus de sujets dans l'étude que si l'exposition était mesurée sans erreur, et le risque relatif estimé sera en moyenne de 1,9 (doublement du risque en cas d'exposition, alors qu'il est en réalité triplé)(de Klerk et coll., 1989).

Dans d'autres cas, l'erreur de classement pourra entraîner une surestimation de l'association entre exposition et maladie, ou une sous-exposition (Jurek et coll., 2005).

L'erreur de classement peut aussi bien concerner l'exposition d'intérêt que la mesure de l'événement de santé ou d'un des facteurs de confusion potentiels. Dans ce cas, l'ajustement sur ce facteur mal mesuré est susceptible de ne pas permettre d'éliminer l'ensemble du biais de confusion (on parle de biais de confusion résiduel). Un tel biais de confusion résiduel peut aussi survenir si le

codage de la variable représentant le facteur de confusion dans le modèle de régression n'est pas approprié (Slama et Werwatz, 2005).

Tableau 21.I : Conséquence de l'erreur de mesure sur l'exposition sur le nombre de sujets nécessaires dans une étude cas-témoins pour garantir une puissance statistique satisfaisante (80 %) et sur le risque relatif caractérisant l'association entre exposition et survenue de la maladie

	Nombre de sujets nécessaires	Risque relatif estimé
Sans erreur de mesure	106 cas, 106 témoins=212	3,0
Avec erreur de mesure (r=0,64)	286 cas, 286 témoins=572	1,9
Avec erreur de mesure (r=0,20)	3 072 cas, 3 072 témoins = 6 144	1,2

Les valeurs sont données pour différents niveaux de corrélation (r) entre la valeur réelle de l'exposition et son estimation avec erreur utilisée dans l'étude épidémiologique (d'après de Klerk et coll., 1989).

La correction des erreurs de classement est plus complexe à mettre en œuvre que la correction des biais de confusion, mais elle est possible. Elle repose généralement sur la quantification de l'erreur de mesure (par exemple en mesurant avec différentes approches le facteur susceptible d'être mal estimé) et sur sa prise en compte dans des analyses de sensibilité pouvant reposer sur des simulations (Lash et Fink, 2003).

Biais de sélection

Il faut noter qu'il n'y a pas de nécessité pour la population étudiée d'être représentative de la population générale du pays. En revanche, la population source d'où est issue la cohorte doit être clairement identifiée, et c'est vis-à-vis de cette population que la représentativité doit être atteinte, afin de limiter les biais de sélection éventuels. Cette représentativité peut être discutée à la lumière du taux de participation et d'une comparaison entre les sujets ayant accepté et ceux ayant refusé de participer. D'autres types de biais de sélection existent, notamment dans les études de cohorte, où un taux important de sujets perdus de vue au cours du suivi peut entraîner un biais de sélection.

Interprétation des résultats d'une étude épidémiologique

Généralement, les résultats d'une étude épidémiologique sont sous la forme d'un paramètre quantifiant l'association entre l'exposition considérée et la caractéristique de santé. Si le paramètre de santé est de nature continue (concentration d'une hormone stéroïdienne, par exemple), le paramètre correspondra à la variation de cette caractéristique entre le groupe exposé et le groupe non-exposé (ou entre 2 groupes ayant des niveaux d'exposition différents). Si la caractéristique de santé est binaire (de type malade/non malade),

le paramètre quantifiant l'association entre exposition et maladie correspondra généralement au rapport entre la probabilité (ou fréquence) de la maladie chez les exposés, par rapport au groupe non exposé. Il s'agira selon l'étude et le modèle statistique d'un risque relatif, risque relatif instantané, ou *odds-ratio*. Un risque relatif de 1,5 signifie que la fréquence de la maladie est augmentée de 50 % chez les sujets exposés, par rapport aux sujets non exposés. Plus rarement, d'autres paramètres sont estimés, tels que la fraction de risque attribuable, ou la proportion de cas de la maladie qu'on peut attribuer à l'exposition considérée. Le paramètre quantifiant l'association entre exposition et maladie est corrigé de l'effet de facteurs de confusion pris en compte, c'est-à-dire qu'il caractérise l'association qu'on observerait s'il n'y avait pas de biais de confusion dû aux facteurs mesurés dans l'étude. Ce paramètre est une mesure d'association statistique mais, en l'absence de biais, elle est souvent interprétée comme une mesure d'impact, ou au moins comme une estimation de l'impact de l'exposition sur la fréquence de la maladie.

Le paramètre quantifiant l'association entre exposition et maladie est toujours assorti d'un intervalle de confiance (généralement à 95 %), et souvent d'un degré de signification, généralement noté « p ». L'intervalle de confiance peut être interprété (un peu abusivement) comme un intervalle qui a de bonnes chances de contenir la vraie valeur du paramètre quantifiant l'association entre exposition et maladie. Il donne une idée de l'amplitude de l'erreur aléatoire, ou encore de la précision de l'étude : si l'intervalle de confiance est large, on peut considérer que l'étude est peu précise, ou encore peu informative (un vaste éventail de valeurs sont possibles pour le paramètre quantifiant l'association entre exposition et maladie) ; si l'intervalle de confiance est étroit, on peut considérer l'étude comme informative. Le degré de signification donne une idée de la probabilité qu'on aurait d'observer une valeur estimée du paramètre quantifiant l'association entre exposition et maladie sous l'hypothèse (notée H_0) où il n'y a pas en réalité d'association entre exposition et maladie, c'est-à-dire si on suppose que le « vrai » risque relatif vaut 1. Plus le degré de signification est faible, moins le résultat observé aurait eu de chances d'être observé s'il n'y avait pas d'association réelle. En conséquence, plus le degré de signification est faible, plus on a tendance à rejeter cette hypothèse H_0 d'une absence d'association entre exposition et maladie : on va donc être tenté de considérer qu'il y a bien une association. Si le degré de signification est élevé, l'association observée est compatible avec l'hypothèse d'une absence d'association, et pourrait être expliquée par des fluctuations aléatoires. En conséquence, on ne peut pas rejeter l'hypothèse H_0. Toutefois, cela ne signifie pas qu'on doive accepter cette hypothèse, et que les résultats indiquent qu'il n'y a pas d'association réelle. Si le degré de signification est élevé, en toute rigueur, on ne peut tirer de conclusion forte dans un sens ou l'autre, et l'étude est peu informative.

Une erreur d'interprétation fréquemment commise est de considérer que deux études ayant des degrés de signification très différents (par exemple valant

0,01 et 0,20, considérés respectivement comme « statistiquement significatif » et « statistiquement non significatif ») sont contradictoires. Le fait que plusieurs études sur une même question aient parfois des degrés de signification inférieurs à 5 % et parfois supérieurs à 5 % ne correspond pas forcément à une situation où la littérature doit être considérée contradictoire. Cette situation est même attendue si l'exposition a un effet réel sur le risque de maladie et si les études réalisées n'ont pas toutes une puissance statistique très élevée. Comparer les « p » n'est donc pas très informatif.

En revanche, une comparaison des intervalles de confiance associés à un même paramètre et tirés de différentes études peut s'avérer très informatif (figure 21.6). En schématisant, si les intervalles de confiance se recoupent assez largement, on peut considérer que la littérature est assez cohérente ou homogène. Il est alors utile de réaliser une méta-analyse de ces études (cf. figure 21.2) qui donnera une estimation de l'association la plus probable, correspondant approximativement à une moyenne des paramètres quantifiant l'association dans les différentes études, ainsi que de l'intervalle de confiance.

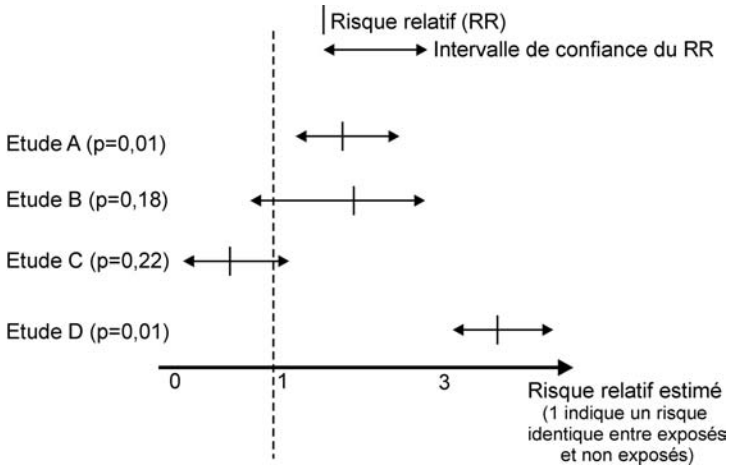


Figure 21.6 : Exemples hypothétiques de risques relatifs (et leur intervalle de confiance et degré de signification) d'études quantifiant toutes une même association entre un facteur d'exposition donné et le risque de survenue d'une maladie (études supposées sans biais)

Le risque relatif issu de l'étude A est statistiquement significatif, celui issu de l'étude B ne l'est pas, et pourtant, considérées simultanément les études A et B sont cohérentes et fournissent l'intervalle de valeurs 1-3 comme le plus probable pour la valeur réelle du risque relatif. Les études B et C ont toutes deux des degrés de signification « non significatifs » au seuil de 5 %, et pourtant elles semblent peu compatibles (l'une indique que le RR est probablement supérieur à 1, l'autre qu'il est probablement inférieur à 1). De même, les études A et D (toutes deux significatives) ne sont pas très cohérentes quant à la valeur la plus probable du RR. Ceci illustre que la cohérence (ou du moins l'homogénéité) de la littérature ne peut être jugée à partir des degrés de signification des études, mais plutôt des intervalles de confiance des mesures d'association.

Si en revanche un grand nombre d'intervalles de confiance sont disjoints (typiquement, un intervalle de confiance allant de 0,2 à 0,9, un autre allant de 1,5 à 7,2), alors on pourra parler d'hétérogénéité des résultats de la littérature, voire de « contradiction ». Tout ceci suppose qu'on considère des études qui sont toutes dépourvues de biais...

Causalité

On peut définir la cause d'une maladie comme étant un événement ou une caractéristique antérieur à la survenue de cette maladie et qui était nécessaire pour que la maladie survienne au moment où elle est survenue, toutes les autres conditions étant fixées. Si la cause avait été absente, la maladie ne serait pas survenue, ou elle serait survenue à un autre moment (Rothman et coll., 2008). Cette définition ne fait pas de distinction entre un facteur qui initierait la survenue de la maladie et un autre qui ne ferait que précipiter sa survenue : tous deux sont considérés comme des causes de la maladie.

Les épidémiologistes utilisent (souvent implicitement) différents modèles de causalité. Un modèle de causalité assez fréquemment considéré est celui des causes suffisantes composées, proposé par Rothman (Rothman 1976 ; Rothman et coll., 2008). Dans ce modèle, chaque cause unique de la maladie n'est généralement ni nécessaire ni suffisante (on peut fumer sans mourir des effets du tabac, ou développer un cancer du poumon sans fumer ni être exposé à la fumée de tabac). En revanche, le modèle considère qu'il existe des causes composées (ensemble de facteurs et caractéristiques), qui sont elles suffisantes pour entraîner la survenue de la maladie chez certains sujets. Pour une maladie donnée, il existe a priori plusieurs causes composées pouvant la déclencher, n'incluant pas toujours les mêmes causes élémentaires, ce qui est cohérent avec l'observation qu'il existe rarement des causes nécessaires à la survenue des maladies complexes.

Une caractéristique importante de la survenue des maladies humaines complexes est leur caractère multicausal. Très peu de maladies ont des causes uniques. Même une maladie comme la phénylcétonurie (arriération mentale résultant d'un trouble du métabolisme d'un acide aminé, la phénylalanine, lui-même dû à une mutation génétique), considérée comme génétique, peut être vue comme environnementale : en effet, une intervention alimentaire appropriée (régime pauvre en phénylalanine) permet d'éviter la manifestation de l'arriération mentale ; le régime alimentaire est donc aussi une des causes de la maladie (Rothman et coll., 2008).

Ceci illustre qu'il n'est pas pertinent d'opposer les causes environnementales et génétiques des maladies : il faut plutôt les voir comme des facteurs intervenant à des niveaux causaux différents, éventuellement emboîtés les uns dans les autres mais en aucun cas opposés ou complémentaires. Une mutation

génétique entraînant la survenue d'une maladie dans la génération n peut avoir été causée par une exposition environnementale à la génération n-1. Et cette exposition environnementale peut elle-même avoir une origine psychosociale. Comme le souligne Rothman, à un certain niveau d'observation, la quasi-totalité des causes peuvent être considérées comme étant de nature génétique, alors qu'à un autre niveau les causes d'une même maladie peuvent être considérées comme étant essentiellement de nature environnementale, sans que ceci soit contradictoire. À ce titre, ainsi que pour d'autres raisons, si on considère que 40 % des cas d'une maladie sont attribuables à des facteurs génétiques, il serait erroné de considérer que 60 % des cas sont attribuables à l'environnement.

Il n'existe pas de recette simple à appliquer pour déterminer si une association rapportée dans une étude épidémiologique est de nature causale. Si on entend parfois parler de « critères de causalité de Bradford Hill » dont il suffirait de vérifier s'ils sont vérifiés par une étude donnée, ceci fait référence à une liste de standards (Hill 1965) qui, s'ils ont, pour certains de la logique (par exemple le « critère » de temporalité, selon lequel la cause doit précéder l'effet), n'ont pas de réel fondement scientifique. Pour reprendre des arguments développés notamment par Rothman (2002), on peut citer le critère de spécificité d'une association : il existe beaucoup de polluants environnementaux ayant des effets sanitaires variés, donc il semble difficile de justifier qu'un facteur apparemment associé à une seule pathologie soit une cause de cette pathologie plus vraisemblable qu'un autre facteur associé à plusieurs pathologies. Un autre exemple, le critère de relation dose-effet (strictement) monotone, qui exclut les associations avec seuil ou les relations en U, qui peuvent correspondre à des effets réels. S'il n'existe pas de critères de causalité aisément applicables, il existe bien des arguments sur la validité interne à une étude et, de manière liée, des niveaux de preuves différents apportés par différents types d'étude. Ces arguments de validité concernent l'absence de biais, ou plus précisément l'absence de biais susceptibles de créer une association ayant l'amplitude observée dans l'étude. Une étude pour laquelle des biais résiduels existent, mais susceptibles d'entraîner une sous-estimation de l'amplitude de l'association, pourra être prise en compte. Concernant le niveau de preuve apporté par différents types d'étude, on considère généralement qu'il décroît quand on va des études randomisées aux études d'observation avec des informations et une analyse au niveau individuel (en privilégiant les cohortes prospectives sur les études rétrospectives), puis jusqu'aux études écologiques spatiales (les études écologiques temporelles, telles que les séries temporelles, peuvent apporter un niveau de preuve élevé, comparable aux études avec des données individuelles). Les études de cas sont considérées comme apportant le niveau de preuve le plus faible.

Si on peut admettre, comme on l'entend souvent, que l'épidémiologie ne permet pas d'établir de relation causale, il ne faut pas oublier de compléter cette affirmation en remarquant que c'est le cas de chacune des disciplines

impliquées dans la santé environnementale. De même qu'une unique étude épidémiologique, aussi bien faite soit elle, ne permet pas d'établir avec certitude la causalité d'une association (ne serait-ce que parce que les associations fortuites dues aux fluctuations aléatoires, si elles deviennent moins probables à mesure que la taille de l'échantillon et la précision des mesures augmentent, ne peuvent jamais être écartées avec certitude), une étude toxicologique ou une expérimentation *in vitro* ne le permettent pas (ce qui ne signifie pas qu'elles ne permettent pas de caractériser le mécanisme d'action du composé) : d'une part, ces autres approches sont elles aussi bien souvent soumises aux fluctuations aléatoires, mais surtout, elles sont limitées au modèle expérimental sur lesquelles elles reposent. La généralisation des résultats à d'autres modèles ou espèces, et notamment à l'espèce humaine, ne relève pas d'un processus scientifique et est généralement entachée d'incertitude : même si on admet qu'une expérience de toxicologie permet d'établir qu'un composé est hépatotoxique chez le rat Wistar, elle ne permettra pas d'établir l'existence d'une telle relation causale dans l'espèce humaine, et il y a même fort à parier que l'effet du composé différerait chez le rat Sprague-Dawley…

En pratique, dans le contexte de la recherche en santé environnementale et de la gestion du risque sanitaire lié aux facteurs environnementaux, il apparaît pertinent de considérer l'établissement de la causalité comme étant essentiellement le fruit d'une expertise scientifique impliquant de nombreuses disciplines. En confrontant les travaux de ces différentes disciplines, les experts « décident » de la plausibilité de l'effet d'un composé sur un paramètre de santé. Ceci peut être vu comme l'élaboration d'une théorie scientifique concernant l'effet de ce composé, qui inclut le métabolisme, les organes, tissus, récepteurs cibles de ce composé, les effets phénotypiques observés et la relation dose-effet attendue à l'échelle de la population. Plutôt qu'une réponse en oui ou non, ce processus est susceptible d'apporter des éléments sur la causalité de façon graduée, indiquant si une association donnée est très peu probable (peu d'éléments en faveur d'un effet causal), probable, très probable… Ce type de classification est similaire dans sa logique à celle utilisée par le Centre international de recherche sur le cancer dans son classement des substances susceptibles d'être cancérogènes.

Perturbateurs endocriniens et santé humaine : vers l'étude épidémiologique idéale

Il n'y a pas d'approche épidémiologique unique pour répondre à une question aussi complexe que celle de l'impact des perturbateurs endocriniens sur un ensemble très varié de paramètres biologiques et de santé. On peut toutefois tirer certaines conclusions sur les méthodes à privilégier à partir des grandes caractéristiques du problème posé.

Ces caractéristiques sont :

- du point de vue des polluants considérés, une multiplicité de composés de différentes natures chimiques, ayant chacun des sources et des voies d'exposition multiples ; des synergies ou antagonismes possibles entre différents polluants. Ces polluants très nombreux ont chacun différents (parfois beaucoup de) métabolites, pour lesquels il est encore rarement possible d'identifier un unique métabolite actif. Beaucoup de ces métabolites sont très peu ou peu persistants dans l'organisme (demi-vie de quelques heures à quelques semaines) ;
- du point de vue de la fenêtre d'exposition, l'existence possible de différentes fenêtres de sensibilité au cours de la vie, avec des hypothèses fortes concernant la fenêtre développementale (vie intra-utérine et premières années de vie) ; une période de latence pouvant être longue (plusieurs années voire dizaines d'années), et des effets pouvant dans certains cas persister ou apparaître dans la descendance de la génération exposée ;
- des mécanismes biologiques complexes, probablement multiples, pouvant impliquer le système endocrinien, d'autres systèmes (système immunitaire ou nerveux par exemple) et, à une autre échelle, l'épigénétique ;
- du point de vue de la relation dose-effet, l'existence possible de relations non strictement monotones et une difficulté de se servir des relations dose-effets obtenues aux doses élevées pour prédire les effets des doses plus faibles ;
- des événements et paramètres biologiques et sanitaires très variés pouvant être influencés par les perturbateurs endocriniens.

Ces caractéristiques incitent à privilégier des approches de type cohorte prospective, adossées à d'importantes biothèques, qui ont l'avantage de permettre :

- d'étudier simultanément différents paramètres de santé ;
- de pouvoir réaliser des prélèvements biologiques répétés durant la période biologiquement pertinente, autorisant le dosage de paramètres biologiques pouvant éclairer les mécanismes en jeu ;
- de doser efficacement et de façon prospective l'exposition à des perturbateurs endocriniens.

Dans le cas où on s'intéresse à l'effet à court ou moyen terme d'expositions à l'âge adulte (par exemple sur des caractéristiques hormonales ou spermatiques), cette approche peut prendre la forme d'un échantillon de quelques dizaines à quelques centaines de sujets chez qui des prélèvements d'urine, éventuellement de sang ou de sperme, sont réalisés de façon répétée sur une période de plusieurs mois à quelques années (Bonde et coll., 1996).

Dans le cas où on s'intéresse à l'effet des expositions durant la vie intra-utérine, le *design* privilégié est probablement celui de la cohorte mère-enfants, consistant à recruter le plus tôt possible durant la grossesse un nombre important de femmes, de réaliser différents prélèvements biologiques répétés chez la mère durant la grossesse puis chez l'enfant après la naissance, et de suivre à moyen et long terme la santé de l'enfant. Un exemple intéressant est celui de

la *Danish National Birth Cohort*, dans laquelle environ 91 800 femmes enceintes ont été recrutées entre 1996 et 2002, et suivies avec leur enfant. Des prélèvements biologiques ont été réalisés en cours de grossesse, à partir desquels les concentrations de composés perfluorés ont été dosés dans un sous-échantillon de la cohorte. Cette étude a d'ores et déjà permis de fournir des informations importantes sur les conséquences possibles de l'exposition durant la grossesse aux composés perfluorés sur la fertilité (Fei et coll., 2009), le déroulement, l'issue de la grossesse (Fei et coll., 2007 et 2008) et le développement de l'enfant (Andersen et coll., 2010).

Pour certains événements de santé très rares (certains cancers notamment), une option serait de combiner les données des grandes cohortes existant dans le monde (de tels efforts sont en cours pour certaines pathologies, par exemple en relation avec les facteurs génétiques). Des études cas-témoins sont envisageables, surtout si elles sont nichées dans des cohortes comprenant une biothèque, pour permettre de disposer d'une estimation prospective de l'exposition.

Bibliographie

ANDERSEN CS, FEI C, GAMBORG M, NOHR EA, SØRENSEN TI, OLSEN J. Prenatal exposures to perfluorinated chemicals and anthropometric measures in infancy. *Am J Epidemiol* 2010, **172** : 1230-127

BELL ML, SAMET JM, DOMINICI F. Time-series studies of particulate matter. *Annu Rev Public Health* 2004, **25** : 247-280

BONDE JP, GIWERCMAN A, ERNST E. Identifying environmental risk to male reproductive function by occupational sperm studies: logistics and design options. *Occup Environ Med* 1996, **53** : 511-519

CANTOR K, VILLANUEVA CM, SILVERMAN DT, FIGUEROA JD, REAL FX, et coll. Polymorphisms in GSTT1, GSTZ1, and CYP2E1, Disinfection byproducts, and risk of bladder cancer in Spain. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 1545-1550

DE KLERK NH, ENGLISH DR, ARMSTRONG BK. A review of the effects of random measurement error on relative risk estimates in epidemiological studies. *Int J Epidemiol* 1989, **18** : 705-712

FEI C, MCLAUGHLIN JK, TARONE RE, OLSEN J. Perfluorinated Chemicals and Fetal Growth: A Study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1677-1682

FEI C, MCLAUGHLIN JK, TARONE RE, OLSEN J. Fetal growth indicators and perfluorinated chemicals: a study in the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol* 2008, **168** : 66-72

FEI C, MCLAUGHLIN JK, LIPWORTH L, OLSEN J. Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod* 2009, **24** : 1200-1205

FERNÁNDEZ MF, RIVAS A, OLEA-SERRANO F, CERRILLO I, MOLINA-MOLINA JM et coll. Assessment of total effective xenoestrogen burden in adipose tissue and identification

of chemicals responsible for the combined estrogenic effect. *Anal Bioanal Chem* 2004, **379** : 163-170

HILL AB. The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of he Royal Society of Medicine* 1965, **58** : 295-300

IBARLUZEA JM J, FERNÁNDEZ MF, SANTA-MARINA L, OLEA-SERRANO MF, RIVAS AM, AURREKOETXEA JJ, et coll. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control* 2004, **15** : 591-600

JENSEN MS, MABECK LM, TOFT G, THULSTRUP AM, BONDE JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod* 2005, **20** : 2559-2566

JUREK AM, GREENLAND S, MALDONADO G, CHURCH TR. Proper interpretation of non-differential misclassification effects: expectations vs observations. *Int J Epidemiol* 2005, **34** : 680-687

KUNZLI N, KAISER R, MEDINA S, STUDNICKA M, CHANEL O, FILLIGER P, et coll. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000, **356** : 795-801

LASH TL, FINK AK. Semi-automated sensitivity analysis to assess systematic errors in observational data. *Epidemiology* 2003, **14** : 451-458

MACLURE M. The case-crossover design: a method for studying transient effects on the risk of acute events. *Am J Epidemiol* 1991, **133** : 144-153

MEEKER JD, EHRLICH S, TOTH TL, WRIGHT DL, CALAFAT AM, TRISINI AT, et coll. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 2010, **30** : 532-539

MEEKER JD, YANG T, YE X, CALAFAT AM, HAUSER R. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. Environ *Health Perspect* 2011, **119** : 252-257

PREAU JL JR, WONG LY, SILVA MJ, NEEDHAM LL, CALAFAT AM. Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 1748-1754

ROTHMAN KJ. Causes 1976. *Am J Epidemiol* 1995, **141** : 90-95, discussion 89

ROTHMAN KJ. Epidemiology. An introduction. New-York, Oxford University Press, 2002

ROTHMAN KJ, GREENLAND S, LASH TL. Modern epidemiology. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2008

SLAMA R, WERWATZ A. Controlling for continuous confounding factors: non- and semi-parametric approaches. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2005, **53** : 2S65-2S80

SLAMA R, CORDIER S. Environmental contaminants and impacts on healthy and successful pregnancies. *In:* Environmental impacts on reproductive health and fertility. WOODRUFF TJ, JANSSEN SJ, GUILLETTE LJ JR, GIUDICE LC (eds). *Cambridge University Press*, 2010

22
Conclusions et perspectives de recherche

Dans le cadre d'un criblage, il est possible de structurer les méthodes d'études en deux niveaux complémentaires. À un premier niveau, se situent les tests simples et rapides qui permettent de réaliser un crible à partir de nombreuses molécules chimiques afin d'identifier lesquelles ont un pouvoir de perturbation endocrine. Les tests *in silico* et *in vitro* (biochimiques ou cellulaires) correspondent à ce premier niveau. À un deuxième niveau, se situent des tests plus perfectionnés pour identifier les modes d'action des substances chimiques en particulier les perturbateurs endocriniens. Les cultures organotypiques et les tests *in vivo*, plus lourds et moins adaptés à un criblage à haut débit, font partie de la deuxième catégorie.

Les tests de la première catégorie (tests *in silico*, *in vitro*, cultures cellulaires) présentent l'avantage de pouvoir travailler sur un nombre très grand d'échantillons et de respecter la règle des trois R qui veut la réduction du nombre d'animaux, le remplacement des animaux quand cela est possible et le raffinement des protocoles de traitement.

Les tests de la deuxième catégorie (culture organotypique et modèles animaux) sont nécessaires pour déterminer et caractériser plus spécifiquement les effets de perturbation endocrine et étudier le métabolisme de ces molécules. Ces tests sont à l'heure actuelle les seuls pouvant tracer le lien avec une atteinte possible de la fertilité ou un changement pathologique.

Il est à souligner le très bon positionnement mondial des équipes françaises de recherche pour les tests cellulaires, les cultures organotypiques et les modèles *in vivo* de xénope et de zebrafish fluorescents. Si certains de ces tests sont en cours de validation à l'ECVAM (tests cellulaires), d'autres (cultures organotypiques, modèles de zebrafish ou de xénope) mériteraient d'être davantage développés pour atteindre le niveau du test validé.

La prédiction d'éventuels effets délétères sur la fonction de reproduction à l'aide des tests de la première catégorie requiert à la fois une meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux de la reproduction (les voies de signalisation impliquées dans les étapes clefs de la reproduction des mammifères sont loin d'être toutes identifiées) et une meilleure compréhension des

mécanismes d'action des substances reprotoxiques *in situ* dans leur(s) tissu(s) cible(s). Le dialogue permanent entretenu entre différents tissus par voie hormonale et au sein d'un même tissu entre différents types cellulaires par voie paracrine est à prendre en considération pour l'étude de la fertilité et donc des cellules germinales, celles-ci ne pouvant pas être cultivées isolément des cellules somatiques de la gonade. Dans ce cadre, un effort conjoint pour soutenir le développement de la recherche appliquée pour la mise en œuvre de tests d'activité de perturbation endocrinienne et la recherche en biologie fondamentale de la reproduction est nécessaire.

L'idée de base associée aux approches « omiques » consiste à appréhender la complexité du vivant dans son ensemble, au moyen de méthodologies les moins restrictives possibles sur le plan descriptif. Les approches de type métabolomique s'intéressent plus particulièrement aux composés chimiques présents au sein des systèmes biologiques étudiés, après la mise en jeu des phénomènes complexes de transcription et de traduction.

La pertinence des études chez l'animal utilisées en toxicologie par rapport à leur extrapolation à l'homme est parfois mise en cause ou non établie. Les modèles *ex vivo* ou *in vitro* provenant d'échantillons humains sont également critiqués puisque, justement, ce ne sont pas des études sur organismes entiers. Toutefois, leur intérêt est réel, en raison de leurs apports sur la connaissance des mécanismes. Il est souvent nécessaire de disposer d'un faisceau d'arguments pour conforter la relation entre les propriétés biologiques d'un facteur de l'environnement et son rôle dans la pathologie. Il faut souligner que la connaissance du mode d'action permet de mieux savoir si des observations faites chez l'animal sont transposables à l'homme.

Un autre paramètre qui complique l'extrapolation des résultats des travaux réalisés à partir de modèles *in vitro* ou avec des animaux de laboratoire à l'être humain est l'hétérogénéité génétique de la population humaine. En effet, bien que cet aspect soit encore quasiment inexploré dans le cadre des perturbateurs endocriniens, divers polymorphismes dans des gènes clefs de la fonction de reproduction sont connus. Ces polymorphismes pourraient modifier l'activité des protéines codées par ces gènes et s'ajouter à l'effet de perturbateurs tels que le phtalate DBP qui perturbe l'expression de l'INSL3. Des polymorphismes ont également été décrits pour les récepteurs aux androgènes (AR) et aux œstrogènes (ER) ainsi que pour SF1 (*steroidogenic factor* 1). Il pourrait exister des individus ou des populations ayant une plus ou moins grande susceptibilité à l'égard des perturbateurs endocriniens du fait de fond génétique différent.

Plus globalement, la notion d'interaction entre gènes et environnement reste très peu explorée dans le cadre de la reprotoxicité. Pourtant, pour certains perturbateurs endocriniens (notamment des phtalates) des effets très différents ont été rapportés d'une espèce à l'autre, parfois même entre deux lignées différentes d'une même espèce.

Les récents progrès dans la maîtrise de la dérivation de cellules souches à partir de cellules différenciées adultes, sont une opportunité nouvelle pour tester l'effet de substances reprotoxiques dans différents types cellulaires chez l'homme. Dans un futur proche, il pourrait même être concevable de prendre en compte les susceptibilités individuelles en reprogrammant des cellules adultes d'un individu donné pour être transformées en cellules, dites iPS (*induced Pluripotent Stem cells)*, ayant les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires, puis en les re-différenciant vers la voie germinale. Ces approches encore théoriques requièrent évidemment au préalable un lourd investissement en terme de recherche fondamentale.

Peu d'études (*in vivo* comme *in vitro*) ont abordé la problématique cruciale des effets de mélanges complexes. En effet, en règle générale c'est la stratégie inverse qui est développée pour l'étude d'un composé unique. Ainsi, il est recommandé de limiter l'exposition des animaux à travers la nourriture, les cages, les biberons à des sources additionnelles de perturbateurs endocriniens lorsque l'on veut mettre en évidence l'effet d'une substance potentiellement reprotoxique. Ces conditions très artificielles sont évidemment très éloignées de l'exposition humaine, chronique et à des mélanges beaucoup plus complexes. Par ailleurs, la plupart des travaux expérimentaux utilisent un composé unique démontrant l'effet de celui-ci à une forte dose, au-delà des seuils estimés d'expositions. Doit-on prendre en compte ces études qui ne ciblent qu'un composé unique à dose forte en imaginant qu'un mélange de plusieurs composés à des doses faibles (compatibles avec l'exposition humaine) peut avoir un effet semblable ? Ou doit-on ne pas prendre en compte tous les travaux impliquant des doses fortes du fait que celles-ci sont « extra environnementales » ?

Au niveau des populations, il n'y a pas d'approche épidémiologique unique pour répondre à une question aussi complexe que celle de l'impact d'une famille aussi vaste que celle des perturbateurs endocriniens sur un ensemble très varié de paramètres biologiques et de santé. Les approches de type cohorte prospective, adossées à d'importantes biothèques, auraient l'avantage de permettre d'étudier simultanément différents paramètres de santé et d'évaluer de façon prospective l'exposition à des perturbateurs endocriniens. De même, il faut souligner l'intérêt des cohortes mères-enfants permettant de suivre à moyen et long terme la santé de l'enfant.

L'interaction entre physiologistes/toxicologistes de la reproduction et biologistes devrait permettre de mettre en relation un phénomène observé au niveau moléculaire (liaison aux récepteurs nucléaires par exemple) et un effet dans le tissu reproducteur où une altération des fonctions physiologiques a été décrite en réponse aux perturbateurs endocriniens. Dans la plupart des cas, c'est une comparaison des effets avec une substance synthétique à activité œstrogénique ou anti-androgénique connue qui est rapportée.

A l'avenir, la détermination des mécanismes d'action en lien avec les effets devrait bénéficier d'un ensemble de méthodologies :

- approches classiques d'étude de l'absorption, distribution et métabolisme des toxiques ;
- utilisation de modèles biologiques cellulaires proches des états physiologiques humains (organotypique) et prise en compte de l'intervariabilité individuelle (cellules iPS) ;
- utilisation de modèles animaux pertinents (souris transgéniques mutantes pour un récepteur) permettant d'appréhender les mécanismes d'action sur les tissus cibles ; ou mammifères non rongeurs ou d'animaux transgéniques humanisés plus représentatifs de la situation humaine ;
- exploration de la perturbation des voies de biosynthèse des hormones naturelles pour identifier les différents niveaux de modification avec des outils de quantification ;
- biologie structurale qui permet de comprendre les interactions des substances avec leurs cibles protéiques cellulaires ;
- techniques haut débit, génomique, protéomique, métabolomique qui permettent une analyse à grande échelle des effets moléculaires potentiels et de rechercher des biomarqueurs d'expositions multiples ;
- application des outils de la biochimie et de la biologie moléculaire aux biothèques constituées dans le cadre des cohortes épidémiologiques ;
- biologie de systèmes qui permet d'intégrer ces informations dans un modèle mathématique global et de prédire les effets à long terme ;
- prise en compte des multi-expositions et utilisation des indicateurs sensibles et faciles à obtenir comme le spermatozoïde ou la durée nécessaire pour avoir un enfant.

V

Bisphénol A

Introduction

Le bisphénol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane en nomenclature IUPAC) (N°CAS 80-05-7), composé de deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone, appartient à la famille des diphénylalcanes hydroxylés ou bisphénols. Découvert par le chimiste russe Alexandre Dianin en 1891, il provient de la condensation de l'acétone avec deux phénols. La réaction est catalysée par l'acide chlorhydrique ou par une résine de polystyrène.

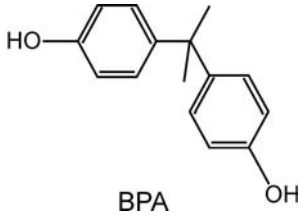


Figure 1 : Structure chimique du bisphénol A (BPA)

Le BPA a fait l'objet de plusieurs évaluations de risque à la demande de différentes agences sanitaires aussi bien en Europe qu'aux États-unis (tableau I). Ces évaluations de risque se sont appuyées principalement sur deux études réalisées par la même équipe (Tyl et coll., 2002 et 2008) selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). À partir de ces études conduites sur plusieurs générations de rats et souris, un NOAEL[17] de 5 000 µg/kg de poids corporel/jour (pc/j) a été établi. Ce NOAEL est établi pour des effets de toxicité systémique. Sur la base de ces travaux, les autorités sanitaires ont défini une dose journalière tolérable pour l'Homme de 50 µg/kg/jour en Europe. En France, depuis juillet 2010, la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de bisphénol A sont suspendues jusqu'à l'adoption, par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Anses, aujourd'hui), d'un avis motivé autorisant éventuellement à nouveau ces opérations[18] .

17. NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level* ; dose sans effet toxique (dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé)
18. Loi n° 2010-729 du 30 juin 2010

Tableau I : NOAEL et doses journalières tolérables (DJT) tirées d'évaluations de risque

Évaluation de risques Date/pays	Étude	NOAEL[a] mg/kg/j	DJT[b] µg/kg/j
SCF 2002/Europe	Tyl et coll., 2002	5	10
ECB 2003/Europe	Tyl et coll., 2002	50	
AIST 2005/Japon	Tyl et coll., 2002	5 ou 50	
EFSA 2006 et 2008/Europe	Tyl et coll., 2002 et 2008	5	50
ECB 2008/Europe	Tyl et coll., 2002 et 2008	50	
NTP - CERHR 2008/États-Unis	Tyl et coll., 2002 et 2008	4,75	
US FDA 2008/États-Unis	Tyl et coll., 2002 et 2008	5	
Health Canada 2008/Canada	Tyl et coll., 2002 et 2008	5	

[a] NOAEL : *No Observable Adverse Effect Level ;* dose sans effet toxique (dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé) ; [b] DJT : dose journalière tolérable

Depuis quelques années, un débat sur les risques liés à l'exposition au BPA agite la communauté scientifique entre les tenants de la toxicologie réglementaire et les endocrinologues (Myers et coll., 2009). Ce débat concerne essentiellement les effets du BPA à de faibles doses. Classiquement, les effets des substances chimiques sont décrits comme suivant une courbe dose/réponse monotone. Cependant, pour certains scientifiques, les substances chimiques environnementales telles que le BPA ayant une activité hormonale ne répondraient pas à ce principe et pourraient provoquer à de faibles doses des effets plus importants, voire opposés, à ceux observés à fortes doses.

Dans le contexte ci-dessus évoqué, le groupe d'experts a mené son analyse sur les effets du BPA en concentrant son attention sur les études récentes (privilégiant les études des cinq dernières années) réalisées aux doses inférieures au NOAEL et il s'est tout particulièrement intéressé aux périodes d'exposition les plus sensibles. Au-delà des critères morphologiques, il a analysé les effets au niveau des tissus et des cellules de l'appareil reproducteur mâle et femelle et tenté de comprendre les mécanismes.

Bibliographie

MYERS JP, ZOELLER RT, VOM SAAL FS. A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1652-1655

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD-1 (Swiss) Mice. *Toxicol Sci* 2008,**104** : 362-384

23
Exposition des populations

Largement présent dans notre environnement quotidien, le bisphénol A (BPA) se retrouve dans le sang et l'urine de la quasi-totalité des populations occidentales. Bien que rapidement éliminé, le BPA est présent à niveau constant dans l'organisme du fait de l'exposition continue. La principale voie d'exposition évoquée est l'alimentation mais peut-être d'autres voies ne sont-elles pas à négliger. Les différences inter-espèces dans les processus d'élimination du BPA justifient d'être prudent dans la transposition à l'Homme des résultats toxicologiques obtenus chez les rongeurs.

Sources et production

Le BPA est utilisé comme monomère dans la fabrication industrielle, par polymérisation, de plastiques de type polycarbonate et comme additif dans les résines époxy. Les polycarbonates entrent dans la composition d'un très grand nombre d'objets courants (CD, lunettes, bouteilles plastiques, biberons), alors que les résines époxy sont principalement utilisées pour réaliser le revêtement intérieur des boîtes de conserves ou dans les amalgames dentaires. Le BPA intervient également comme inhibiteur de polymérisation pour le PVC, comme antioxydant dans les plastifiants ou encore comme agent actif dans les papiers thermosensibles.

Selon les données fournies par l'industrie (*Plastics Europe*), la production mondiale de BPA est supérieure à 3 millions de tonnes par année. Il n'est pas produit en France mais dans l'Union européenne à hauteur de 700 000 tonnes par an pour une consommation totale à l'intérieur de l'Union européenne. Environ 75 % de la production européenne est destinée à la fabrication de polycarbonate. D'après les données de 2005 et 2006, 1,15 million de tonnes de BPA sont utilisés par année dans l'Union européenne.

Modalités et voies d'exposition

Selon les agences d'évaluation du risque (EFSA, 2004 et 2006 ; NTP-CERHR, 2008), la principale voie d'exposition de la population générale est

la voie alimentaire. Dans la mesure où le BPA est un constituant des polymères plastiques utilisés pour emballer ou contenir les aliments, cette exposition relève d'une part des monomères résiduels de BPA présents dans ces matériaux et susceptibles de migrer dans l'aliment, et d'autre part du BPA qui peut être libéré par l'hydrolyse du polymère, en particulier au cours du chauffage, comme cela peut se produire pour les biberons en polycarbonate par exemple. Cette migration est d'autant plus importante que le polycarbonate a été utilisé à de nombreuses reprises (Brede et coll., 2003) ou qu'il est au contact de solutions alcalines (Biedermann-Brem et Grob, 2009). Dans des conditions normales d'utilisation d'un biberon, cette migration est de quelques µg/l d'eau ou de lait (Maragou et coll., 2008). Chez les adultes, la consommation de boissons contenues dans des bouteilles en polycarbonates (Carwile et coll., 2009), d'aliments en conserve (Mariscal-Arcas et coll., 2009 ; Lim et coll., 2009b) ou de denrées chauffées au micro-onde dans leur emballage plastique (Lim et coll., 2009a) se traduit par des valeurs d'exposition moyennes voisines de 0,033 µg/kg de pc/j alors qu'elles sont environ 25 fois plus élevées pour le nourrisson nourri au biberon en polycarbonate (von Goetz et coll., 2010) soit 0,800 µg/kg/j. Cette dose est très inférieure à la dose journalière tolérable pour l'homme (50 µg/kg/j) mais compatible avec des expositions étudiées chez l'animal et décrites dans les chapitres suivants. Les autres modalités d'exposition telles que celles provenant de la manipulation de papiers thermosensibles ont été considérées jusqu'à présent comme négligeables pour le consommateur (EFSA, 2004 ; NTP-CERHR, 2008). Toutefois, les études publiées en 2010 montrent que l'exposition des personnes en contact répété avec du papier d'imprimante thermique, comme les caissières de supermarchés, pouvait dépasser 70 µg par jour (Biedermann et coll., 2010). En ce qui concerne la contamination de l'air ambiant, les travaux publiés au cours des trois dernières années indiquent que les poussières domestiques peuvent contenir plus de 1 500 µg/kg de BPA (Völkel et coll., 2008 ; Geens et coll., 2009) et que cette valeur peut être 5 fois plus élevée pour des poussières collectées dans des bureaux (Geens et coll., 2009). Par ailleurs, les calculs d'estimation de l'absorption cutanée du BPA font mention d'une valeur de 10 % de la dose appliquée (*European commission*, 2003), ce que semblent confirmer les travaux de Kaddar et coll. (2008) à partir d'un modèle de peau de porc. Cependant, des données récentes obtenues sur des explants de peau humaine tendent à montrer que ce taux est largement sous-estimé (Zalko et coll., 2011) et qu'il peut varier d'un facteur 10 selon les individus (Marquet et coll., 2011).

Plusieurs auteurs ont étudié l'exposition faisant suite à l'application de scellements dentaires à base d'amalgames composés de BPA. Olea et coll. (1996) ont mesuré les concentrations salivaires en BPA chez des patients auxquels avaient été appliqués des amalgames composés de bis-glycidyldiméthacrylate et de bisphénol A-diméthylacrylate. Les niveaux de BPA salivaire observés chez 17 patients variaient de 3 000 à 30 000 µg/l de salive. Joskow et coll. (2006) ont pu mesurer les concentrations en BPA dans la salive et dans l'urine

de 14 patients ayant reçu des scellements dentaires de différente nature. Les concentrations moyennes mesurées dans la salive étaient respectivement de 0,54 et 42,8 µg/l, alors que les concentrations urinaires maximales étaient observées une heure après l'application et correspondaient respectivement à 7,26 et 27,3 µg/l, de 2 à 10 fois supérieurs aux taux moyens habituellement observés (voir paragraphe ci-dessous).

Imprégnation des populations humaines

Les mesures de concentrations de BPA effectuées dans le sang, l'urine, le lait maternel et d'autres tissus humains confirment que les populations occidentales présentent, dans leur très large majorité, des niveaux détectables de BPA.

Mesures dans le sang

Des mesures ont été réalisées chez les femmes enceintes ou en suites de couche. Sur la base d'analyses en LC-MS/MS effectuées sur des prélèvements sanguins pratiqués chez 40 femmes du Michigan au moment de l'accouchement, Padmanabhan et coll. (2008) ont observé des niveaux plasmatiques en BPA inchangé variant de 0,5 (limite de détection) à 22,3 µg/l (moyenne=5,9 µg/l). Dans une étude analogue portant sur 300 femmes coréennes au moment de l'accouchement, Lee et coll. (2008) ont trouvé des concentrations plasmatiques comprises entre la limite de détection et 66,48 µg/l alors que dans le sang du cordon, les valeurs ne dépassaient pas 8,86 µg/l. Ces valeurs sont sensiblement plus élevées que celles relevées par Chapin et coll. (2008) dans leur revue bibliographique dans laquelle les concentrations plasmatiques moyennes chez les femmes enceintes ne dépassent pas 4,4 µg/l.

En se fondant sur des données pharmacocinétiques qui seront détaillées plus loin, Goodman et coll. (2009) soulignent l'incohérence entre ces valeurs de concentration plasmatiques et les données d'exposition (en µg/kg/j) actuellement disponibles. De même, les modèles PB-PK appliqués par Mielke et Gundert-Remy (2009) font apparaître que les scénarios d'exposition mettant en jeu les doses les plus élevées devraient conduire à des niveaux plasmatiques circulant en BPA libre cent fois plus faibles que ceux qui sont rapportés dans la littérature. Cette incohérence a conduit beaucoup d'équipes à préférer l'utilisation des quantités totales de bisphénol A éliminées dans l'urine comme marqueur d'exposition à ce contaminant.

Mesures dans l'urine

Dans l'étude réalisée sur 2 517 sujets de la cohorte *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), des échantillons d'urine ont été

analysés en chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les résultats montrent que le BPA et/ou ses métabolites sont présents dans l'urine de 93 % des Américains (Calafat et coll., 2008). La concentration urinaire moyenne tous âges confondus est de 2,6±0,3 µg/l. Cette étude montre par ailleurs que les niveaux de BPA urinaire total (BPA libre et conjugué) diffèrent en fonction de l'âge (figure 23.1), de l'ethnie, du sexe et du lieu d'habitation.

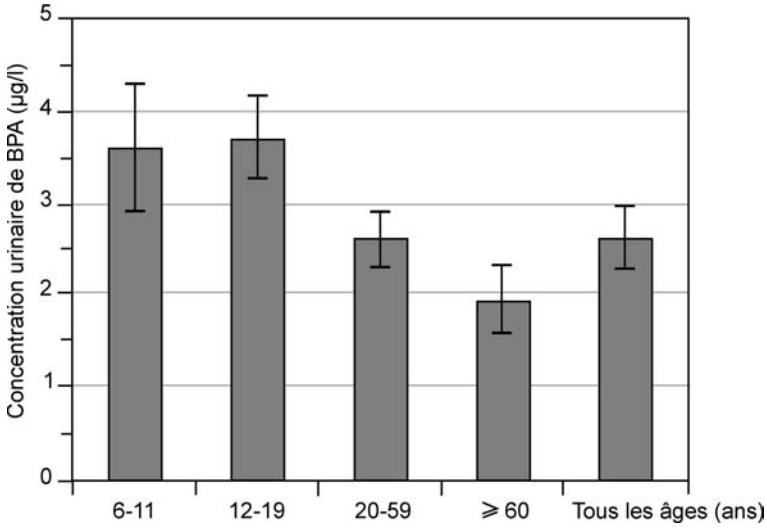


Figure 23.1 : Concentrations urinaires de BPA total dans différentes tranches d'âge de la population générale aux États-Unis (valeurs=moyennes±écart-type, n total=2 517) (d'après Calafat et coll., 2008)

Ces mêmes auteurs ont procédé à l'analyse en LC-MS/MS des urines de 40 nourrissons prématurés placés en soins intensifs (Calafat et coll., 2009). Chez ces enfants, les niveaux de BPA total urinaire s'élèvent à 30,3±5,2 µg/l, démontrant la surexposition aux monomères des plastiques à laquelle sont soumis ces bébés, sans que la source ait pu être déterminée de façon précise.

En Allemagne, une étude menée chez 599 enfants âgés de 3 à 14 ans fait apparaître des taux urinaires moyens de BPA total de 2,7 µg/l (Becker et coll., 2009). Ce sont chez les enfants les plus jeunes (3-5 ans) que les concentrations les plus élevées ont été observées (3,5 µg/l).

En France, l'étude pilote « Elfe » (Étude longitudinale depuis l'enfance), réalisée sur les départements de Seine Saint-Denis, Ardèche, Loire, Isère et Savoie en octobre 2007 a permis de recueillir 279 échantillons d'urine chez les mères en salle de naissance. Parmi ces échantillons, 258 dosages de BPA libre et total ont été réalisés par extraction liquide/liquide, puis analyse en LC/MS-MS avec une limite de détection fixée à 0,10 µg/l et de quantification à 0,30 µg/l. Les résultats ont montré une détection de bisphénol A chez plus

de 90 % des femmes. Les concentrations en bisphénol A total et libre avaient une valeur médiane de respectivement 2,9 et 0,5 g/g de créatinine, et le ratio BPA libre/BPA total de 0,17. Ces concentrations médianes urinaires en BPA sont similaires à celles retrouvées dans d'autres études (Vandentorren et coll., 2011).

Estimation de l'exposition à partir des mesures urinaires

À partir des données produites par Calafat et coll. (2008) évoquées précédemment, Lakind et Naiman (2008) ont calculé des niveaux d'exposition des individus au BPA fondés sur les modèles pharmacocinétiques disponibles. Ces estimations correspondent à des moyennes de 0,0334-0,0563 µg/kg pc/j pour des adultes de 20 à 60 ans et de 0,0674 µg pour des enfants de 6 à 11 ans. Ces valeurs sont conformes aux estimations des expositions établies sur la base des consommations alimentaires mentionnées précédemment (von Goetz et coll., 2010).

Mesures dans le lait et le liquide amniotique

Quelques auteurs ont également trouvé des teneurs mesurables de BPA dans le lait de femme. Calafat et coll. (2006) rapportent des concentrations médianes d'environ 1,4 µg de BPA total/l chez 32 sujets. Ye et coll. (2006) ont détecté du BPA dans 18 échantillons sur 20. Dans 12 échantillons, la présence de BPA inchangé a été détectée (médiane des concentrations=0,4 µg/l) alors que la médiane des concentrations en BPA total était de 1,1 µg/l.

Engel et coll. (2006) ont mesuré les concentrations de BPA total dans le liquide amniotique à partir de 21 échantillons prélevés au cours d'amniocentèses effectuées avant la 20e semaine de grossesse. Le BPA a été détecté dans 10 % des échantillons à l'aide d'un système HPLC équipé d'un détecteur électrochimique. Des concentrations comprises entre la limite de détection (0,5 µg/l) et 1,96 µg/l ont été observées.

Mesure dans le tissu adipeux

Le BPA a été mesuré dans différents tissus chez l'Homme, parmi lesquels le tissu adipeux. Olea et coll. (2008) ont montré que les teneurs dans le tissu adipeux étaient en moyenne de 17,46±14,82 µg/kg de tissu adipeux chez l'enfant.

La rétention de BPA dans le tissu adipeux a également été observée chez l'animal. Nunez et coll. (2001) ont mesuré les résidus de BPA dans le tissu adipeux de rates ovariectomisées ayant reçu pendant 15 jours une dose sous-cutanée de BPA (1 mg/j) administrée par une pompe osmotique. Les valeurs obtenues en fin d'expérimentation indiquent des niveaux de BPA pouvant

dépasser 3 000 µg/kg dans le tissu adipeux brun et 100 µg/kg pour le tissu adipeux péri-ovarien.

Métabolisme et toxicocinétique

Le métabolisme du BPA chez l'Homme et dans les différentes espèces utilisées dans les études toxicologiques est important à connaître pour évaluer l'éventuelle toxicité du BPA et pour discuter les possibles transpositions de l'animal à l'Homme.

Il s'agit de savoir si cette substance est bioaccumulable, convertie en une molécule plus active (activation métabolique) ou au contraire moins active (détoxication métabolique).

Conjugaison, élimination

Les expérimentations menées chez l'homme adulte montrent que le BPA est totalement absorbé par la voie digestive. Il est ensuite pris en charge par les enzymes de biotransformation intestinales et hépatiques, principalement celles responsables de la conjugaison des xénobiotiques.

Völkel et coll. (2002) ont administré sous forme de gélule 5 000 µg en dose unique de BPA marqué au deutérium à des volontaires humains des deux sexes (correspondant à des doses variant de 50 à 90 µg/kg). Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à intervalles réguliers au cours des heures qui ont suivi l'administration et ces échantillons ont fait l'objet d'analyses en GC-MS/MS et LC-MS/MS avant et après hydrolyse à la β-glucuronidase. Les résultats obtenus indiquent que le pic plasmatique est atteint environ 80 minutes après l'ingestion (concentration=800 nmol/l) et que le BPA circulant est presque exclusivement sous la forme de conjugué à l'acide glucuronique (BPA-glucuronide), ce qui suggère un large effet de premier passage et une faible biodisponibilité du BPA.

Le BPA-glucuronide est rapidement éliminé dans l'urine et aucun autre métabolite n'a été retrouvé par ces auteurs. Des concentrations urinaires en BPA (exclusivement sous forme de BPA-glucuronide) d'environ 4,4 µg/ml ont été rapportées (valeur observée dans les urines prélevées au cours des 6 premières heures). La même équipe (Völkel et coll., 2005) a répété l'expérimentation en donnant une dose plus faible (25 µg de BPA administré dans l'eau de boisson à six volontaires). Les niveaux urinaires de BPA et BPA-glucuronide ont été mesurés au cours des 7 h suivant l'ingestion, indiquant des concentrations maximales en BPA total de 9,6 ng/ml (valeurs obtenues pour les échantillons 0-3 heures), le BPA libre n'ayant pu être détecté que dans 2 échantillons (LOQ=3,4 µg/l). Des travaux analogues menés par Tsukioka et coll. (2004) chez un seul individu recevant par voie orale 100 µg de BPA deutéré

indiquent une concentration urinaire maximale en BPA total de 90 ng/ml (30 minutes après le traitement).

Ces travaux démontrent chez l'homme adulte une élimination rapide et complète du BPA ingéré dans l'urine sous forme de BPA-glucuronide, mais ne reflètent pas forcément les conditions d'exposition chronique au BPA de la population générale. Par ailleurs, on ne sait pas si ces données sont extrapolables au nourrisson, plus exposé et plus sensible que l'adulte au BPA. En outre, plusieurs études d'exposition révèlent la présence de BPA libre dans l'urine pour environ 10 % des échantillons (Ye et coll., 2005 ; Völkel et coll., 2008). Ce résultat, qui dépend en grande partie de la sensibilité, la spécificité et la robustesse de la méthode utilisée pour l'analyse des résidus, a été l'objet de controverses (Dekant et Vökel, 2008). Il ne peut, en effet, pas être exclu que les traces de BPA libre retrouvées dans l'urine puissent provenir de contaminations au cours de l'analyse elle-même (Völkel et coll., 2008) ou encore de l'hydrolyse du conjugué après le prélèvement urinaire, libérant de ce fait le composé parent (Waechter et coll., 2007).

Toxicocinétique

En dépit des données nombreuses dont on dispose sur la toxicocinétique du BPA chez l'animal et l'homme, plusieurs zones d'ombre subsistent. En premier lieu figure le fait qu'au cours du jeûne, compte tenu de la demi-vie plasmatique du BPA de 4-6 h et de l'exposition supposée essentiellement alimentaire à cet agent chimique, il devrait être observé une diminution graduelle des niveaux d'excrétion urinaire du BPA et/ou de ses métabolites. D'après Stahlhut et coll. (2009), un jeûne de 24 h n'a pas d'effet significatif sur les taux d'élimination totale du BPA (libre + conjugué) dans l'urine. En effet, les concentrations médianes observées chez 129 sujets de la cohorte américaine NHANES sont de 2,6 µg/g de créatinine pour les prélèvements 0-4,5 h et pour 899 individus de 2,4 µg/g de créatinine pour les prélèvements 8,5-24 h après le début du jeûne. Ces données suggèrent aux auteurs que l'exposition alimentaire n'est pas nécessairement prépondérante, que les cinétiques d'élimination observées pour une dose unique ne sont peut-être pas extrapolables à l'exposition continue, que le BPA pourrait être retenu dans un compartiment tel que le tissu adipeux, ou encore que le BPA urinaire pourrait provenir d'autres contaminants que le BPA (par exemple les BPA halogénés). Il faut souligner que dans cette étude, les modélisations de l'élimination urinaire ont été faites à partir d'un seul dosage par individu, ce qui semble insuffisant pour tirer des conclusions.

Différences inter-espèces dans les processus d'élimination

Si les données expérimentales obtenues chez l'animal confirment que le BPA est rapidement absorbé dans le tube digestif et qu'il est rapidement éliminé, elles font également apparaître des différences entre les rongeurs, chez lesquels

a été réalisé le plus grand nombre d'études, et l'homme. Les extrapolations des données de pharmacocinétiques de l'animal à l'homme sont rendues délicates en raison d'importantes différences inter-espèces pour ce qui concerne l'existence ou non d'un cycle entérohépatique dans le processus d'élimination du BPA conjugué à l'acide glucuronique. En effet, chez le rat ce métabolite est éliminé pour partie dans la bile pour être, après hydrolyse dans la lumière intestinale, réabsorbé par la paroi intestinale (Upmeier et coll., 2000 ; Kurebayashi et coll., 2003). Ce processus n'a pas lieu chez l'homme, ce qui a pour conséquence une élimination plus rapide. De ce fait, la demi-vie plasmatique du BPA chez l'homme est de 4 à 6 heures (Völkel et coll., 2002 et 2005) et l'élimination est complète en 24 heures. Des valeurs semblables ont été récemment rapportées chez les rongeurs et le singe (Doerge et coll., 2010a, 2010b ; Taylor et coll., 2010).

En outre, chez le rat c'est majoritairement l'isoforme 2B1 de l'UDP-glucuronosyl transférase (UGT2B1) qui prend en charge la glucuronidation du BPA (Yokota et coll., 1999). Chez l'homme, c'est principalement l'UGT2B15 qui est responsable de cette glucuro-conjugaison (Hanioka et coll., 2008). Le polymorphisme génétique de l'UGT2B15 pourrait entraîner d'importantes variabilités interindividuelles en matière de capacité de détoxication du BPA chez l'homme. S'il est vrai que l'expression des UGT est limitée chez le fœtus et pendant les premiers jours de la vie, ces enzymes sont suffisamment actives pour métaboliser de faibles doses de BPA comme le montre l'étude de Calafat et coll. (2009), qui a mis en évidence des glucuro-conjugués du BPA dans les urines de nourrissons prématurés.

Les voies de biotransformation du BPA sont également de nature et d'intensité différentes selon les espèces. Les données recueillies chez l'Homme montrent que le BPA-glucuronide est le métabolite majoritaire puisqu'il représente plus de 90 % de la forme circulante et des métabolites urinaires (figure 23.2). Le BPA-sulfate est plus rarement identifié et quantifié. Kim et coll. (2003) ont démontré chez des sujets coréens masculins (N=15) et féminins (N=15) que le BPA-sulfate était bien présent. Chez les hommes, les niveaux de BPA-sulfate et BPA-glucuronide étaient respectivement de 0,49±0,27 et 2,34±0,85 µg/l alors que chez les femmes ces concentrations étaient respectivement de 1,20±0,32 et 1,0±0,34 µg/l. Ces deux formes représentent des voies de détoxication du BPA dans la mesure où elles ne sont pas actives sur les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, on peut s'interroger sur la possibilité d'une déconjugaison dans certains organes cibles de ces métabolites.Très récemment, Nishikawa et coll. (2010) ont en effet montré chez des rates en gestation dont l'utérus a été perfusé par de faibles doses de BPA-glucuronide que la déconjugaison de ce métabolite avait bien lieu dans le liquide amniotique et le fœtus, libérant de ce fait du BPA. Chez le rongeur, la conjugaison à l'acide glucuronique représente bien la voie majoritaire, mais l'aglycone n'est pas exclusivement du BPA inchangé, mais pour partie du BPA hydroxylé

(Zalko et coll., 2003). Plusieurs autres métabolites ont néanmoins été identifiés, tels que le BPA di-glucuronide, ou des conjugués méthoxylés (Zalko et coll., 2003).

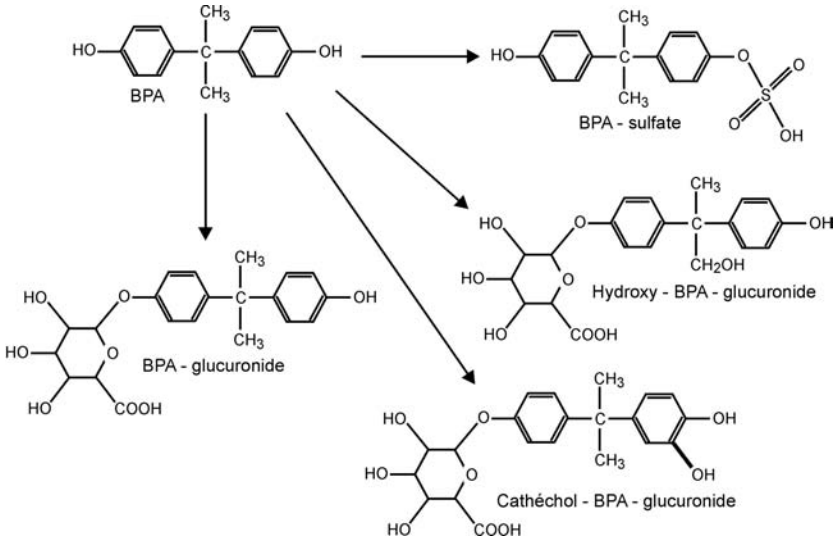


Figure 23.2 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (chez l'homme, la voie prépondérante est celle qui conduit au BPA–glucuronide)

Différences inter-espèces dans les liaisons aux protéines plasmatiques

Un élément déterminant des caractéristiques pharmacocinétiques des perturbateurs endocriniens en général et du BPA en particulier repose sur les capacités du composé à se lier aux protéines plasmatiques. La forme liée du BPA inchangé représente environ 90 à 95 % du BPA circulant et la forme libre environ 5 à 10 % du total (Csanady et coll., 2002 ; Kurebayashi et coll., 2002 ; Mayersohn, 2003). L'Homme et le singe semblent disposer d'une fraction libre réduite (5 %) (Csanady et coll., 2002) en comparaison du rat (5 à 10 %) (Mayersohn, 2003). L'impact de cette liaison aux protéines au regard de la biodisponibilité du BPA vis-à-vis des tissus cibles potentiels, en particulier ceux qui ne disposent pas de capacités métaboliques importantes telles que l'encéphale ou l'utérus, peut avoir une incidence en matière de toxicité. En effet, cette liaison est de nature à moduler non seulement les capacités d'accès du BPA au niveau de l'organe, mais également son accessibilité aux récepteurs nucléaires ou membranaires. Les données publiées par Milligan et coll. (1998) indiquent que le BPA a une très faible affinité pour l'α-fœtoprotéine humaine, ce qui laisse supposer une incapacité à déplacer les ligands endogènes tels que l'œstradiol et donc à provoquer des effets biologiques de ces stéroïdes sur le fœtus. En revanche, cette faible liaison protège mal le fœtus des effets directs du BPA.

En conclusion, les taux urinaires de BPA sont respectivement de 2,5 µg/l chez l'adulte et de 3,5 µg/l chez les enfants. Les estimations à partir de ces données donnent des niveaux d'exposition de l'ordre de 0,03 µg/kg/j de BPA chez l'adulte, de 0,07 µg/kg/j chez l'enfant de 6-11 ans. Une autre étude évalue l'exposition des nourrissons nourris aux biberons à 0,75 µg/kg/j, de même que le rapport récent (*Joint FAO/WHO expert meeting to review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Summary report 1-5 novembre 2010*)[19].

La conjugaison est la principale voie de détoxication du BPA. Les formes conjuguées ne sont plus actives sur les récepteurs aux œstrogènes mais des déconjugaisons libérant du BPA ont été observées au niveau du liquide amniotique et du fœtus. Les données de toxicocinétique disponibles font apparaître des incohérences entre l'exposition estimée de la population générale au BPA et les concentrations plasmatiques observées chez les européens ou les américains .

Bibliographie

BECKER K, GUEN T, SEIWERT M, CONRAD A, PICK-FUSS H, et coll. GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009, **212** : 685-692

BIEDERMANN-BREM S,GROB K. Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor. *European Food Research and Technology* 2009, **228** : 679-684

BIEDERMANN S, TSCHUDIN P, GROB K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 2010, **398** : 571-576

BREDE C, FJELDAL P, SKJEVRAK I, HERIKSTAD H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam* 2003, **20** : 684-689

CALAFAT AM, YE X, SILVA MJ, KUKLENYIK Z, NEEDHAM LL. Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring. *Int J Androl* 2006, **29** : 166-171

CALAFAT AM, YE X, WONG LY, REIDY JA, NEEDHAM LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 39-44

CALAFAT AM, WEUVE J, YE X, JIA LT, HU H, et coll. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 639-644

CARWILE JL, LUU HT, BASSETT LS, DRISCOLL DA, YUAN C, et coll. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1368-1372

19. ftp://fao.org/ag/agns/BPA_Summary_Report.pdf

CHAPIN RE, ADAMS J, BOEKELHEIDE K, GRAY LE, JR., HAYWARD SW, et coll. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008, **83** : 157-395

CSANADY GA, OBERSTE-FRIELINGHAUS H, SEMDER B, BAUR C, SCHNEIDER K, FILSER JG. Distribution and unspecific protein binding of the xenœstrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* 2002, **76** : 299-305

DEKANT W, VÖLKEL W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring : methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **228** : 114-134

DOERGE , TWADDLE NC, VANLANDINGHAM M, FISHER JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010a, **247** : 158-165

DOERGE DE, TWADDLE NC, WOODLING KA, FISHER JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010b, **248** : 1-11

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to the introduction of a Fat (consumption) Reduction Factor for infants and children (Question No EFSA-Q-2003-070) Adopted on 5 October 2004. *The EFSA-Journal* 2004, **103** : 1-8

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). Question number EFSA-Q-2005-100. Adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 2006, **428** : 1-75

ENGEL SM, LEVY B, LIU Z, KAPLAN D, WOLFF MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2006, **21** : 110-112

EUROPEAN COMMISSION. European Union Risk assessment Report. CAS No : 80-05-7 EINECS No : 201-245-8 - 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol A). European commission (Ed). 2003 : 302p

GEENS T, ROOSENS L, NEELS H, COVACI A. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 2009, **76** : 755-760

GOODMAN JE, WITORSCH RJ, MCCONNELL EE, SIPES IG, SLAYTON TM, et coll. Weight-of-evidence evaluation of reproductive and developmental effects of low doses of bisphenol A. *Crit Rev Toxicol* 2009, **39** : 1-75

HANIOKA N, NAITO T, NARIMATSU S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 2008, **74** : 33-36

JOSKOW R, BARR DB, BARR JR, CALAFAT AM, NEEDHAM LL, et coll. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants.*J Am Dent Assoc* 2006, **137** : 353-362

KADDAR N, HARTHE C, DECHAUD H, MAPPUS E, PUGEAT M. Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A* 2008, **71** : 471-473

KIM YH, KIM CS, PARK S, HAN SY, PYO MY, YANG M. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **312** : 441-448

KUREBAYASHI H, BETSUI H, OHNO Y. Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 2003, **73** : 17-25

KUREBAYASHI H, HARADA R, STEWART RK, NUMATA H, OHNO Y. Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 32-42

LAKIND JS, NAIMAN DQ. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010, Mar 17 [Epub ahead of print]

LEE YJ, RYU HY, KIM HK, MIN CS,LEE JH, et coll. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008, **25** : 413-419

LIM DS, KWACK SJ, KIM KB, KIM HS, LEE BM. Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A* 2009a, **72** : 1285-1291

LIM DS, KWACK SJ, KIM KB, KIM HS, LEE BM. Risk assessment of bisphenol A migrated from canned foods in Korea. *J Toxicol Environ Health A* 2009b, **72** : 1327-1335

MARAGOU NC, MAKRI A, LAMPI EN, THOMAIDIS NS, KOUPPARIS MA. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008, **25** : 373-383

MARISCAL-ARCAS M, RIVAS A, GRANADA A, MONTEAGUDO C, MURCIA MA, et coll. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol* 2009, **47** : 506-510

MARQUET F, PAYAN JP, BEYDON D, WATHIER L, GRANDCLAUDE MC, FERRARI E. In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [(14)C]-bisphenol A in rats : a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol* 2011, Feb 2

MAYERSOHN M. Bisphenol A : Characterization of Plasma Protein Binding in Rats. College of Pharmacy, University of Ariszona, Tuscon, Arizona, 2003

MIELKE H, GUNDERT-REMY U. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett* 2009, **190** : 32-40

MILLIGAN SR, KHAN O, NASH M. Competitive binding of xenobiotic estrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) plasma. *Gen Comp Endocrinol* 1998, **112** : 89-95

NISHIKAWA M, IWANO H, YANAGISAWA R, KOIKE N, INOUE H, et coll. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 1196-1203

NTP-CERHR. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Bisphenol A. NIH PUBLICATION (Ed). 2008 : 300p

NUNEZ AA, KANNAN K, GIESY JP, FANG J, CLEMENS LG. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 2001, **42** : 917-922

OLEA N, PULGAR R, PEREZ P, OLEA-SERRANO F, RIVAS A, et coll. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996, **104** : 298-305

OLEA N, ARREBOLA JP, TAOUFIKI J, FERNANDEZ-VALADES R, PRADA R, et coll. Alkylphenols and bisphenol-A and its chlorinated derivatives in adipose tissue of children. *In:* Environmental toxicology II. 110, KUNGOLOS A, ZAMORANO M (eds). Wit transactions on ecology and the environment, WIT Press, 2008 : 129-138

PADMANABHAN V, SIEFERT K, RANSOM S, JOHNSON T, PINKERTON J, et coll. Maternal bisphenol-A levels at delivery : a looming problem? *J Perinatol* 2008, **28** : 258-263

STAHLHUT RW, WELSHONS W, SWAN SH. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 784-789

TAYLOR JA, VOM SAAL FS, WELSHONS WV, DRURY B, ROTTINGHAUS G, et coll. Similarity of Bisphenol A Pharmacokinetics in Rhesus Monkeys and Mice : Relevance for Human Exposure. *Environ Health Perspect* 2010 Sep 20

TSUKIOKA T, TERASAWA J, SATO S, HATAYAMA Y, MAKINO T, NAKAZAWA H. Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *J Environ Chem* 2004, **14** : 57-63

UPMEIER A, DEGEN GH, DIEL P, MICHNA H, BOLT HM. Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch Toxicol* 2000, **74** : 431-436

VANDENTORREN S, ZEMAN F, MORIN L, SARTER H, BIDONDO ML, et coll. Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: implications for large-scale biomonitoring studies. *Environ Res* 2011 (sous presse)

VÖLKEL W, COLNOT T, CSANADY GA, FILSER JG, DEKANT W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002, **15** : 1281-1287

VÖLKEL W, BITTNER N, DEKANT W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol Aglucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.*Drug Metab Dispos* 2005, **33** : 1748-1757

VÖLKEL W, KIRANOGLU M, FROMME H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett* 2008, **179** : 155-162

VON GOETZ N, WORMUTH M, SCHERINGER M, HUNGERBUHLER K. Bisphenol A : How the Most Relevant Exposure Sources Contribute to Total Consumer Exposure.*Risk Anal* 2010

WAECHTER J, THORNTON C, MARKHAM D, DOMORADZKI J. Factors affecting the accuracy of bisphenol a and bisphenol a-monoglucuronide estimates in Mammalian tissues and urine samples.*Toxicol Mech Methods* 2007, **17** : 13-24

YE X, KUKLENYIK Z, NEEDHAM LL, CALAFAT AM. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005, **383** : 638-644

YE X, KUKLENYIK Z, NEEDHAMLL, CALAFAT AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006, **831** : 110-115

YOKOTA H, IWANO H, ENDO M, KOBAYASHI T, INOUE H, et coll. Glucuronidation of the environmental estrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 1999, **340** : 405-409

ZALKO D, SOTO AM, DOLO L, DORIO C, RATHAHAO E, et coll. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model : answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 309-319

ZALKO D, JACQUES C, DUPLAN H, BRUEL S, PERDU E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2011, **82** : 424-430

24
Études épidémiologiques

Au cours des dix dernières années, quelques études épidémiologiques ont été réalisées pour documenter l'impact sanitaire potentiel de l'exposition au bisphénol A (BPA) dans l'espèce humaine, notamment pour apprécier les conséquences d'une exposition sur la fonction de reproduction chez l'homme et la femme.

Effets sur la fonction de reproduction masculine

Trois études réalisées à Aichi (Japon) en milieu professionnel, auprès d'hommes consultant pour infertilité dans un service hospitalier du Massachusetts (État-Unis) ainsi qu'auprès de partenaires de femmes enceintes recrutés aux États-Unis (*Study for Future Families*) ont caractérisé l'association entre l'exposition au BPA et la concentration plasmatique de certaines hormones gonadotropes ou gonadiques (Hanaoka et coll., 2002 ; Meeker et coll., 2010a ; Mendiola et coll., 2010).

Une étude réalisée en Chine entre 2004 et 2008 a comparé la fonction sexuelle de travailleurs potentiellement exposés au bisphénol A avec celle de travailleurs non exposés (Li et coll., 2010a ; Li et coll, 2010b). L'effet potentiel du bisphénol A sur les caractéristiques spermatiques a également été caractérisé par Li et coll. (2010c), ainsi que dans deux populations américaines de patients consultant pour infertilité dans un service hospitalier du Massachusetts (Meeker et coll., 2010b) et auprès des partenaires de femmes enceintes de la *Study for Future Families* (Mendiola et coll., 2010).

Hormones gonadotropes, gonadiques et thyroïdiennes

L'étude réalisée par Hanaoka et coll. (2002) dans la préfecture d'Aichi reposait sur une approche transversale auprès de 42 travailleurs utilisant le diglycidyléther de bisphénol A (bisphénol A diglycidyl éther, ou BADGE) mélangé à des solvants organiques afin de durcir des résines époxy, recrutés dans 3 usines, qui ont été comparés à 42 travailleurs des mêmes usines mais qui n'utilisaient pas de BADGE. Les travailleurs non exposés ont été appariés aux travailleurs exposés en termes d'âge (à 3 ans près) et de nombre de cigarettes

fumées quotidiennement. Un prélèvement urinaire a eu lieu entre 10 et 12 h du matin afin de doser la concentration en BPA et en métabolites de solvants organiques auxquels les travailleurs étaient potentiellement exposés ; une prise de sang le même jour a permis le dosage des concentrations plasmatiques de 3 hormones (LH, FSH et testostérone). Le niveau médian de bisphénol A était environ le double pour les travailleurs utilisant le BADGE que pour ceux ne l'utilisant pas ; la moyenne était supérieure de 2,5 µMol/Mol de créatinine pour les exposés (p=0,002) (tableau 24.I).

Les niveaux médians de LH et testostérone libre étaient similaires chez les travailleurs exposés au BADGE et ceux qui ne l'étaient pas. La concentration de FSH plasmatique tendait à diminuer en fonction de la concentration urinaire de bisphénol A (p=0,05, après ajustement sur l'âge et la consommation d'alcool), mais apparemment pas sur les concentrations des métabolites des solvants organiques. La concentration urinaire d'acide 2-butoxyacétique, métabolite du 2-méthoxy éthanol (solvant organique), dosé lui aussi dans les urines, tendait également à être associée au niveau de FSH plasmatique (p=0,12).

La corrélation entre le bisphénol A et l'acide 2-butoxyacétique (probable car les auteurs indiquent que le BADGE est utilisé conjointement à des solvants organiques) n'a pas été rapportée, ce qui ne permet pas d'apprécier complètement dans quelle mesure ce métabolite pouvait expliquer l'association statistique entre bisphénol A et FSH.

L'étude réalisée dans le Massachusetts par Meeker et coll. (2010a) concernait des hommes consultant pour infertilité et a priori non exposés professionnellement. L'étude américaine s'est intéressée à davantage de paramètres hormonaux, et notamment l'inhibine B (marqueur de l'activité des cellules de Sertoli, qui sont les cellules de soutien de la spermatogenèse dans le testicule) et les hormones liées à la fonction thyroïdienne. Les hommes inclus étaient âgés de 18 à 55 ans, sans vasectomie, consultant au laboratoire d'andrologie du *Massachusetts General Hospital* (Boston). Le taux de participation approximatif des sujets éligibles approchés était de 65 %, et 167 hommes ont pu être recrutés. La concentration de bisphénol A a été estimée à partir de prélèvements urinaires réalisés le même jour que les prélèvements de sérum ayant permis les dosages hormonaux. La concentration urinaire de bisphénol A était associée à une augmentation du taux plasmatique de FSH (contrairement à l'étude de Hanaoka et coll., 2002), à une diminution du taux d'inhibine B et du ratio œstradiol/testostérone (considéré comme un marqueur de l'activité aromatase), ainsi qu'à une augmentation du ratio FSH/inhibine B (considéré comme un marqueur de l'activité des cellules de Sertoli). De façon statistiquement non significative, le taux de LH avait tendance à augmenter avec l'exposition (p=0,07). Le taux de bisphénol A n'était pas associé aux concentrations d'hormones thyroïdiennes (TSH, triiodothyronine T3, tétraïodothyronine T4).

Pour 75 hommes, des prélèvements urinaires ayant permis des dosages supplémentaires du bisphénol A ont été réalisés dans la période suivant le jour du prélèvement sanguin lors duquel le dosage hormonal a été fait ; l'objectif de ces dosages supplémentaires était d'améliorer l'estimation de l'exposition en utilisant la moyenne de plusieurs dosages plutôt qu'un unique dosage du BPA. La pertinence de l'approche utilisée est discutable, dans la mesure où la taille de l'échantillon était bien plus faible que dans l'analyse principale, et où les dosages supplémentaires de BPA ont eu lieu ultérieurement aux dosages hormonaux. Les analyses statistiques ont été répétées, en prenant cette fois en compte la moyenne géométrique des dosages de bisphénol A successifs. Dans ce sous-groupe, les paramètres caractérisant les associations entre bisphénol A et dosages hormonaux étaient très similaires qu'on estime la dose de bisphénol A à partir du premier dosage ou des dosages successifs. Les dosages additionnels de bisphénol A ayant été réalisés après le dosage des hormones plasmatiques, cette nouvelle analyse présente un intérêt limité et doit être interprétée avec prudence, d'autant que le nombre de sujets était bien plus faible que dans l'analyse principale. Elle n'apportait donc pas réellement d'information supplémentaire par rapport aux résultats rapportés plus haut.

La principale limitation de ces deux études est leur approche transversale, consistant en un dosage simultané des niveaux de bisphénol A et des paramètres hormonaux d'intérêt. Un tel protocole ne permet pas d'estimer l'imprégnation au bisphénol A dans la fenêtre de temps biologiquement pertinente qui, si elle n'est pas connue avec précision, est nécessairement antérieure à la période du dosage hormonal ; selon que cette fenêtre est située quelques jours, quelques mois ou années avant le moment où les paramètres hormonaux sont dosés, le niveau de bisphénol A le jour du dosage hormonal représentera plus ou moins bien la dose dans la fenêtre d'exposition biologiquement pertinente. Ce protocole ne permet pas non plus d'écarter un biais de causalité inverse, qui pourrait survenir si le statut hormonal était associé à une modification du métabolisme du bisphénol A, ce qui serait susceptible d'entraîner une association statistique entre dosages hormonaux et concentration urinaire de bisphénol A dans laquelle les variations des concentrations hormonales seraient la cause et non pas la conséquence de l'exposition au bisphénol A. Un protocole plus satisfaisant pour documenter les effets à court terme de polluants ayant une demi-vie dans l'organisme courte (Bonde, *et coll.*, 1996) consisterait à réaliser des dosages urinaires répétés de bisphénol A, suivis d'un ou plusieurs dosages hormonaux, et de mettre en relation les niveaux de bisphénol A (moyennés sur une certaine fenêtre temporelle) avec le statut hormonal ultérieur. Toutefois, il faut noter que ce protocole assez lourd à mettre en œuvre est jusqu'ici très rare dans la littérature, en particulier lors des premières études réalisées sur un contaminant.

Enfin, Mendiola et coll (2010) ont abordé la problématique de l'influence possible du BPA sur les caractéristiques hormonales parmi les hommes de la *Study For Future Families* réalisée dans quatre villes des États-Unis. Cette

étude transversale diffère des études mentionnées ci-dessus essentiellement par le fait qu'elle ne concernait que des hommes dont la partenaire était enceinte lors du recrutement, et donc fertile. Au total, 317 hommes recrutés entre 1999 et 2005 dans 4 villes de Californie, Iowa, Minnesota et Missouri ont été pris en compte. Des recueils d'urine (à partir duquel le BPA a été dosé), de sang (permettant les dosages hormonaux) ainsi que de sperme (voir plus bas, caractéristiques spermatiques) ont été réalisés le même jour. Une analyse par régression multiple ajustée sur les facteurs de confusion potentiels a indiqué une diminution de l'indice d'androgènes libres (*free androgen index*, FAI) et du ratio FAI/LH en association avec le BPA. Les concentrations sériques de SHBG étaient positivement associées au BPA. Des associations non significatives statistiquement au seuil retenu par les auteurs étaient observées entre le BPA et le ratio testostérone libre/LH (corrélation négative) et entre le BPA et la concentration sérique de LH (corrélation positive). Le taux estimé de testostérone libre n'était pas associé au BPA, pas plus que la concentration d'inhibine B ou de FSH.

Comme les études précédentes, celle-ci est limitée par sa nature transversale. Les résultats de cette étude forment un ensemble peu cohérent avec ceux décrits par Meeker et coll. (2010a) ; ceux-ci (voir plus haut) avaient rapporté que le bisphénol A était associé à une augmentation du taux plasmatique de FSH, à une diminution du taux d'inhibine B et du ratio œstradiol/testostérone, ainsi qu'à une augmentation du ratio FSH/inhibine B.

Dysfonction sexuelle

L'étude transversale portant sur la fonction sexuelle (Li et coll., 2010a) a consisté à identifier une usine produisant du bisphénol A et trois usines en utilisant (usines dites exposées), à chercher à y recruter tous les travailleurs masculins exposés au bisphénol A, et à estimer par questionnaire la fréquence de certains troubles de la fonction sexuelle, déclarés lors d'un entretien en face-à-face standardisé. La fréquence de ces troubles a été comparée à celle observée selon une même approche dans une population témoin constituée de travailleurs d'usines n'utilisant pas de bisphénol A, et de conjoints masculins de femmes non exposées recrutées dans ces usines pour une étude ancillaire portant sur la santé de la femme. Le taux de participation des 373 travailleurs potentiellement exposés éligibles était de 62 %, d'où 46 travailleurs à la retraite ont été exclus ; parmi les travailleurs participant, 20 travailleurs (9,2 % des travailleurs exposés acceptant de participer) ont été exclus car ils n'ont pas répondu aux questions sur la vie sexuelle, d'après les auteurs bien souvent du fait d'une absence d'activité sexuelle récente. Parmi les travailleurs des usines n'utilisant pas de bisphénol A, le taux de participation des travailleurs éligibles était de 55 % ; ce groupe a été augmenté d'un groupe de 120 conjoints de femmes travaillant dans les usines non exposées (taux de participation non mentionné). Parmi ces travailleurs non exposés participant, 18 (4,4 % des sujets non exposés participant) ont été exclus du fait d'une

absence de réponse aux questions sur l'activité sexuelle, ce qui correspond à un taux inférieur de moitié à celui constaté parmi les travailleurs exposés. Au final, 164 travailleurs potentiellement exposés et 386 travailleurs n'utilisant pas de bisphénol A ont participé.

La proportion d'hommes rapportant une difficulté à obtenir une érection était de 15,5 % chez les travailleurs considérés exposés, contre 4,4 % chez les travailleurs considérés non exposés, ce qui correspondait à un *odds-ratio* de trouble de l'érection de 3,9 après ajustement (intervalle de confiance à 95 %, 1,8 à 8,5). Une augmentation nette statistiquement et d'amplitude élevée était également observée pour toutes les autres caractéristiques de la vie sexuelle étudiées en relation avec l'exposition au bisphénol A (tableau 24.I). Ces associations se maintenaient après exclusion des sujets déclarant avoir été exposés à d'autres produits chimiques ou à des métaux lourds à un moment quelconque de leur vie professionnelle, exposition quatre fois plus fréquente chez les travailleurs du groupe exposé au bisphénol A. L'association entre ces autres expositions et les caractéristiques de la vie sexuelle n'a pas été décrite.

En outre, les auteurs ont quantifié les niveaux de bisphénol A dans l'air de certains ateliers des usines produisant ou utilisant du bisphénol A, ainsi que les concentrations urinaires chez un sous-échantillon des travailleurs considérés exposés (n=123) et non exposés (n=254). Ces dosages ont confirmé qu'en médiane, les travailleurs du groupe considéré exposé étaient effectivement davantage exposés (dose médiane, 58 µg/g créatinine, 25-75e centiles, 13-467) que les travailleurs du groupe considéré non exposé (dose médiane, 1 µg/g créatinine, 25-75e centiles, 0-11). Les dosages dans l'air ont permis de construire un indice d'exposition (combinant les niveaux de bisphénol A mesurés dans chaque atelier au nombre d'années passé par chaque travailleur dans l'atelier). Dans des analyses prenant en compte cet indice (en choisissant toujours le groupe des travailleurs des usines n'utilisant pas de bisphénol A comme référence), les auteurs ont décrit l'évolution des *odds-ratio* de troubles de la vie sexuelle entre le groupe non exposé et les 3 tertiles d'exposition au bisphénol A. Une association dose-réponse monotone a été observée entre niveau croissant d'exposition cumulée au BPA et risque de dysfonction sexuelle.

On notera que, si l'objectif précis de l'étude n'avait pas été indiqué aux ouvriers lors du lancement de ce travail, on peut s'attendre à ce que cet objectif ait été connu dès que les premiers ouvriers ont répondu au questionnaire ; de plus, les entretiens ne se faisaient probablement pas à l'aveugle du statut du travailleur vis-à-vis de l'exposition, cette exposition étant totalement définie par la connaissance de l'usine, où les entretiens ont apparemment eu lieu. Ceci a pu avoir une influence sur la fréquence des troubles de la fonction sexuelle estimée dans les usines utilisant et n'utilisant pas de bisphénol A. Cette limite ne s'applique pas à l'analyse restreinte aux travailleurs non exposés (Li et coll., 2010a). L'écart très important dans la fréquence des troubles de la vie sexuelle entre les sujets exposés et non exposés mérite d'être

noté, et pourrait être attribué à un biais (par exemple celui mentionné ci-dessus) et/ou à un effet très important de l'exposition au bisphénol A (environ 50 fois plus élevée parmi les travailleurs exposés qu'en population générale) et des expositions corrélées au bisphénol A et non prises en compte dans l'étude. On peut également évoquer un biais potentiel lié au choix des valeurs seuils des événements de la vie sexuelle estimés à partir d'une échelle, choix dont le principe n'a pas été explicité.

Dans une seconde publication (Li et coll., 2010b), les auteurs ont réalisé des analyses complémentaires dans un sous-groupe des sujets inclus dans la première étude. Cette nouvelle publication est limitée à 427 travailleurs de la première étude chez qui un dosage de BPA a été réalisé dans les urines (à partir d'un échantillon dont le calendrier de prélèvement par rapport au moment de l'entretien sur la fonction sexuelle n'est pas indiqué). Cette analyse, qui n'est pas indépendante de la précédente, retrouve une association entre exposition au BPA (cette fois estimée sur une échelle quantitative) et la dysfonction sexuelle. L'apport principal de cette nouvelle publication est de proposer une analyse restreinte aux 253 sujets ne travaillant pas à un poste auquel ils étaient exposés au BPA. La dose médiane de BPA dans cette population était de 1,2 µg/g créatinine (25-75e percentiles, 0 à 11,4 µg/g créatinine), contre 53,7 µg/g créatinine chez les travailleurs exposés (25-75e percentiles, 8,6 à 558,9 µg/g créatinine). Les doses internes de BPA chez les travailleurs non exposés étaient donc proches de celles généralement constatées en population générale. Dans le groupe de travailleurs non exposés, les coefficients quantifiant l'association entre le niveau urinaire de BPA et certains marqueurs de la fonction sexuelle (notamment le désir sexuel et la satisfaction générale avec sa vie sexuelle) étaient similaires à ceux rapportés pour l'ensemble des 427 travailleurs, bien que l'association soit statistiquement moins nette (en terme de p-valeur), avec un effectif plus réduit. Les auteurs indiquent que les résultats étaient sensibles aux observations extrêmes (« *outliers* »), sans préciser de quelle façon. Le principal intérêt de cette nouvelle étude (Li et coll., 2010b) par rapport à la précédente (Li et coll., 2010a) est lié au groupe de population étudiée, c'est-à-dire les travailleurs non exposés, qui permet de caractériser une population dont les niveaux d'exposition sont du même ordre de grandeur que ceux de la population générale, et de limiter le biais possible lié à la connaissance par l'enquêteur du statut des travailleurs vis-à-vis de l'exposition.

Caractéristiques spermatiques

Trois études transversales ont caractérisé l'association entre l'exposition au BPA et les caractéristiques spermatiques, à partir de populations de partenaires de femmes enceintes recrutés dans 4 villes des États-Unis (Mendiola et coll., 2010), d'hommes recrutés dans une clinique d'infertilité du Massachusetts (Meeker et coll., 2010b) et de travailleurs chinois exposés professionnellement au BPA (Li et coll., 2010c). Ces travaux s'appuient sur les populations

à partir desquelles l'association entre BPA et caractéristiques hormonales (Mendiola et coll., 2010 ; Meeker et coll., 2010a) et entre BPA et dysfonction sexuelle (Li et coll., 2010a) avaient respectivement été décrites.

L'étude de Meeker et coll. (2010b) concernait 190 hommes du Massachusetts, chez qui le BPA a été dosé dans les urines (taux de détection, 89 %) ; le prélèvement urinaire avait lieu le même jour que le recueil de sperme. La concentration urinaire de BPA (codée en continu) était associée à une diminution de la concentration spermatique (p=0,05), de la mobilité spermatique (p=0,10), et de la proportion de spermatozoïdes avec une morphologie considérée normale (p=0,05). Quand il était estimé pour une augmentation correspondant à l'écart entre le 1e et le 3e quartiles de la concentration de BPA et prédit pour les sujets dont les caractéristiques spermatiques correspondaient à la médiane observée dans la population, l'effet estimé du BPA correspondait à une diminution de la concentration spermatique de 23 % (IC 95 %, [-40 ; 0%]), de la mobilité spermatique de 7,5 % (IC 95 % [-17 ; +2 %]) et de 13 % de la proportion de spermatozoïdes avec une morphologie considérée normale (IC 95 %, [-26 % ; 0 %]). Il n'y avait pas d'association nette avec la numération spermatique totale (p=0,27). L'exposition au BPA était également associée à une augmentation de la fragmentation de l'ADN du noyau des spermatozoïdes, estimée à l'aide du test de la comète chez 132 hommes. Une autre publication de la même équipe a indiqué que cette association entre BPA et fragmentation de l'ADN spermatique persistait après ajustement sur les niveaux de butyl-parabène (Meeker et coll., 2011). Quand les caractéristiques spermatiques étaient analysées de façon dichotomique (inférieures *versus* supérieures aux niveaux de référence), les associations avec le BPA allaient aussi dans le sens d'une altération de ces caractéristiques spermatiques avec l'exposition au BPA, tout en étant moins nettes statistiquement.

La principale limitation de cette étude est liée à son caractère transversal qui, dans la mesure où la durée de vie dans l'organisme humain du BPA est faible, empêche d'estimer l'exposition dans les mois ou les années précédant la mesure des caractéristiques spermatiques.

Li et coll. (2010c) ont étudié une population de 218 hommes, dont 130 étaient exposés professionnellement. L'exposition au BPA était estimée à partir d'un dosage urinaire. Cette exposition était associée à une diminution de la concentration, de la numération totale, de la vitalité et de la mobilité spermatiques. La morphologie spermatique n'était pas associée à la concentration de BPA (p=0,95). L'intégrité de l'ADN n'avait pas été étudiée par Li et coll. Comme dans l'étude sur la dysfonction érectile (Li et coll., 2010), les auteurs ont répété l'analyse en excluant les hommes exposés professionnellement, pour discuter si les associations observées sont susceptibles d'être aussi observées aux doses « environnementales » ; les doses internes des hommes exposés professionnellement étaient en effet environ 50 fois supérieures à celles des hommes non exposés professionnellement. Parmi les 88 hommes non exposés professionnellement, la concentration urinaire de BPA était

associée à une diminution de la concentration spermatique (p=0,02), et de la numération totale (p=0,04). Les paramètres des modèles de régression estimant l'association entre ces deux caractéristiques spermatiques et le BPA urinaires étaient en valeur absolue similaires ou supérieurs à ceux estimés en incluant les hommes exposés professionnellement. En revanche, pour ce qui concerne la vitalité ou la mobilité spermatiques, le paramètre avait tendance à se rapprocher de 0, sans qu'on puisse dire si ceci était dû à une modification de la relation dose-réponse aux doses plus faibles ou à une perte de précision due à la forte diminution de l'effectif après restriction aux hommes non exposés professionnellement.

Enfin, Mendiola et coll. (2010) ont étudié eux aussi l'association entre BPA et caractéristiques spermatiques dans la *Study for Future Families*, réalisée dans 4 villes des États-Unis. Dans l'ensemble, l'analyse, portant sur 317 partenaires de femme enceinte, ne mettait pas en évidence d'association entre BPA et caractéristiques spermatiques (concentration, mobilité, morphologie), estimées à partir d'un recueil réalisé le même jour que le prélèvement urinaire. Le fait que l'étude ait porté sur des hommes tous fertiles a pu limiter la variabilité des caractéristiques spermatiques dans la population, et donc diminuer la puissance statistique de l'étude, par rapport à une étude incluant hommes fertiles et moins fertiles.

Effets sur la fonction de reproduction féminine

Quatre études conduites chez la femme sont rapportées (tableau 24.II). Elles se sont intéressées respectivement aux taux d'hormone, à l'endométriose, au cancer du sein et à la survenue de fausses couches spontanées.

Hormones

Une étude rétrospective a porté sur un groupe de 19 femmes non obèses, 7 femmes obèses avec des cycles menstruels considérés normaux, 7 patientes souffrant d'hyperprolactinémie, 21 femmes souffrant d'aménorrhée d'origine hypothalamique et 19 femmes avec un syndrome des ovaires polykystiques, dont 6 étaient obèses (Takeuchi et coll., 2004). Le taux sérique de bisphénol A a été dosé et corrélé à des dosages hormonaux dans l'ensemble de la population. Une association était notamment retrouvée pour la testostérone totale et libre, l'androstènedione et le DHEAS (déhydroépiandrostérone).

Cette étude est difficile à interpréter, du fait notamment de son caractère rétrospectif, gênant dans le cas des pathologies considérées, et de l'absence d'information sur le plan d'échantillonnage (il s'agit apparemment d'un échantillon de population de convenance). La corrélation entre bisphénol A et paramètres hormonaux ne peut pas être interprétée, dans la mesure où les

pathologies des sujets (toutes associées à des variations possibles du métabolisme ou du comportement alimentaire, source d'exposition au bisphénol A) n'ont pas été prises en compte.

Endométriose

Deux études se sont intéressées à la relation entre endométriose et taux de bisphénol. Une étude italienne portait sur 69 femmes fertiles consultant à l'hôpital de Naples, pour troubles du cycle menstruel, kystes ovariens ou douleurs pelviennes chroniques (Cobellis et coll., 2009). Au sein de cette population, 58 femmes souffraient d'endométriose (cas), alors que 11 femmes n'avaient pas d'endométriose, et ont été comparées aux cas. Le taux de détection du bisphénol A dans le sang était très faible, ce qui est une limite de l'étude. Le taux de détection du bisphénol A était de 0 % parmi les 11 « témoins », et de 52 % chez les cas. Le niveau de bisphénol A n'a pu être quantifié que pour environ 25 % des cas.

Antérieurement, une étude réalisée sur une population de 140 patientes japonaises choisies parmi 166 femmes se plaignant de stérilité (Itoh et coll., 2007) n'a pas trouvé de différence dans le taux urinaire de bisphénol A entre les femmes avec un diagnostic d'endométriose et celles sans endométriose. Ces deux études utilisent des technologies distinctes pour doser le bisphénol et concernent des populations différentes. Comme pour l'étude sur les concentrations hormonales (Takeuchi et coll., 2004), le dosage rétrospectif du bisphénol A est particulièrement problématique, et ne permet pas de savoir si c'est le taux de bisphénol A qui est susceptible d'influencer la survenue d'endométriose, ou le contraire. Dans l'ensemble, ces études rétrospectives en milieu clinique sont méthodologiquement limitées (absence de plan d'échantillonnage, d'estimation du taux de participation, approche rétrospective...).

Cancer du sein

À notre connaissance, une seule étude épidémiologique a cherché à caractériser l'influence de l'exposition au BPA sur le risque de cancer du sein chez l'humain (Yang et coll., 2009). L'étude était de type cas-témoins, et a porté sur 70 femmes chez qui un cancer du sein a été diagnostiqué (entre 1994 et 1997) à l'hôpital national universitaire de Séoul (Corée du Sud), et 82 femmes témoins appariées sur l'âge et recrutées dans le même hôpital, où elles consultaient du fait d'inquiétudes concernant le cancer du sein, mais chez qui la pathologie n'a finalement pas été diagnostiquée. Le BPA n'était détectable dans le sang que d'environ 51 % des sujets (différence éventuelle entre cas et témoins non indiquée). Il n'y avait pas de différence nette dans le taux de BPA entre les cas (médiane, 0,61 µg/l) et les témoins (médiane, 0,03 µg/l, test de Wilcoxon, p=0,42). La limite importante de cette étude est que le prélèvement ayant permis le dosage du BPA a été fait après le diagnostic du cancer du sein, et qu'il s'agit d'un unique prélèvement, ne permettant pas d'estimer

l'exposition moyenne, dans une fenêtre d'exposition cohérente avec celle suggérée dans l'expérimentation animale (exposition fœtale ou périnatale). Le fait de prélever le sang après le diagnostic ne permet pas d'exclure que le taux de BPA est influencé par le statut des sujets vis-à-vis de la maladie (modification des taux de BPA du fait des traitements, de changements de comportement, ou de modifications physiologiques induites par la maladie). Par ailleurs, l'effectif considéré est modeste, et la proportion élevée de valeurs non détectées diminue l'aptitude de l'étude à caractériser efficacement l'impact du BPA sur le cancer du sein.

Effets sur la survie fœtale/survenue de fausse-couche spontanée

Sugiura-Ogasawara et coll. (2005) ont dosé le bisphénol A dans le sérum de femmes de Nagoya (Japon) ayant un antécédent d'au moins 3 fausses-couches spontanées (45 femmes), ainsi que chez 32 femmes n'ayant jamais accouché et n'ayant pas d'antécédent d'infécondité. Les taux de bisphénol A étaient plus élevés chez les femmes ayant un antécédent de 3 fausses couches spontanées. Les auteurs ont aussi réalisé un suivi prospectif de l'ensemble de ces femmes, chez qui 35 grossesses ont été observées, dont 17 fausses couches spontanées. Les femmes ayant eu une fausse couche spontanée au cours du suivi avaient un taux de bisphénol A plus élevé que celles ayant eu une naissance vivante, sans que la différence soit statistiquement significative d'après les auteurs.

Cette étude est difficile à interpréter du fait de l'approche rétrospective, et du choix d'un groupe de comparaison qui semble peu adapté. Un groupe de femmes ayant obtenu une naissance vivante aurait permis de discuter si le niveau de bisphénol A différait selon l'issue de la grossesse ; une mesure de l'exposition avant la survenue de la grossesse plutôt qu'après aurait permis d'éliminer un biais de causalité inverse, qui pourrait créer une différence dans le taux de bisphénol A entre les groupes comparés si le fait d'avoir une grossesse entraînait une modification du taux de bisphénol A (par exemple via une modification du métabolisme, des comportements, notamment alimentaires, de la corpulence...). La partie prospective de l'étude est elle aussi difficile à interpréter du fait de la modalité de sélection de l'échantillon. Cette étude, prise isolément, peut donc être considérée comme étant très peu informative sur l'association entre exposition au bisphénol A et risque de fausse couche spontanée.

Autres effets potentiels du bisphénol A n'entrant pas dans le champ de l'expertise

On peut noter qu'un petit nombre d'études chez l'Homme ont cherché à caractériser l'impact potentiel de l'exposition au bisphénol A sur d'autres

événements de santé n'entrant pas dans le champ de cette expertise, et notamment le stress oxydatif et des marqueurs d'inflammation (Yang et coll., 2009), la croissance fœtale (Wolff, et coll., 2008), le comportement de l'enfant (Braun, et coll., 2009 ; Longnecker, 2009), la survenue de diabète et la fonction hépatique (Lang et coll., 2008).

En conclusion, dans l'ensemble, les études épidémiologiques sont trop peu nombreuses pour déterminer la plausibilité chez l'Homme des effets observés dans l'expérimentation animale. À l'heure actuelle, les études réalisées chez la femme concernant le risque de cancer du sein ou d'endométriose reposent toutes sur une approche rétrospective (particulièrement limitée pour un composé non persistant comme le bisphénol A) et des populations cliniques de convenance, sans plan d'échantillonnage précis. Du côté masculin, une étude en Chine suggère une association entre exposition professionnelle au BPA et troubles de la fonction sexuelle ; de plus, deux études, à partir de cette même population, et d'une population d'hommes consultant auprès d'une clinique d'infertilité du Massachusetts, ont rapporté une diminution de la concentration spermatique en association avec l'exposition au BPA à l'âge adulte, à des doses correspondant aux niveaux rencontrés en population générale. La cohérence de ces deux études et leur caractère transversal impliquent de considérer sérieusement l'hypothèse d'un effet du BPA à l'âge adulte sur la concentration spermatique. La confirmation ou l'infirmation de la plausibilité de retrouver chez l'homme certains des effets mis en évidence dans l'expérimentation animale à la suite d'expositions durant la phase du développement impliquerait la réalisation d'études avec un suivi régulier des expositions chez la femme enceinte puis un suivi sanitaire de sa descendance, longues et lourdes méthodologiquement, auprès de populations de taille importante.

Tableau 24.I : Études concernant les effets possibles de l'exposition masculine humaine au bisphénol A ou BADGE sur des paramètres de fertilité

Étude	Population	Exposition			Paramètres de santé[a]	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Co-expositions	Estimation	
Fonction hormonale						
Hanaoka et coll., 2002 Aichi (Japon)	42 travailleurs exposés, affectation à un poste où le BADGE est utilisé 42 travailleurs non exposés	Dosage urinaire de bisphénol A (prélèvement urinaire et plasmatique le même jour)	Médiane [min-max] : Exposés : 1,1 [<LOD-11] µg/mol créatinine Non exposés : 0,5 [<LOD-11] µg/mol créatinine	Solvants organiques	Dosage plasmatique de LH, FSH, T libre	↓ de la FSH (p=0,05) chez les exposés par rapport aux non exposés ; Pas de différence nette de LH (p=0,65) , T libre (p=0,17) ; après ajustement sur l'âge et la consommation d'alcool
Meeker et coll., 2010a Massachusetts (États-Unis)	167 patients masculins consultant pour infertilité	Dosage urinaire (prélèvement urinaire et plasmatique le même jour)	Médiane et moyenne géométrique [25e-75e percentiles] : 1,3 [0,7-2,4] µg/l de BPA	Non décrites	Dosage plasmatique LH, FSH, Inhibine B, FSH/ Inhibine B, T, T libre, SHBG, FAI, T/LH, E2, E2/T, proline, T4 libre, T3 totale, TSH	↑ de FSH, FSH/ Inhibine B et E2/T ↓ de Inhibine B
Mendiola et coll., 2010 (4 villes des États-Unis)	375 hommes partenaires de femme enceinte	Dosage urinaire (prélèvement urinaire et sanguin le même jour)	50e percentile [25e-75e percentiles] 1,7 [0,80-3,0] µg de BPA/l d'urine	Non décrites	Dosage plasmatique LH, FSH, T, Inhibine B, SHBG, E2, FAI, T libre, FAI/LH, FT/LH, T/E2 ratio, T/LH	↓ FAI (*free androgen index*) et ratio FAI/LH ↑ SHBG

Étude	Population	Exposition			Paramètres de santé[a]	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Co-expositions	Estimation	
Caractéristiques spermatiques						
Meeker et coll., 2010b Massachusetts (États-Unis)	190 patients masculins consultant pour infertilité	Dosage urinaire (prélèvement urinaire et recueil de sperme le même jour)	Médiane et moyenne géométrique [25e-75e percentiles] : 1,3 [0,8-2,5] µg de BPA par l d'urine	Non décrites	Caractéristiques spermatiques	Concentration urinaire de BPA (codée en continu) associée à ↓concentration spermatique (p=0,05), ↓mobilité spermatique (p=0,10), ↓ proportion de spermatozoïdes avec une morphologie considérée normale (p=0,05) ↑fragmentation de l'ADN du noyau des spermatozoïdes
Li et coll., 2010c (Chine)	218 hommes (130 exposés professionnellement et 88 non exposés professionnellement	Activité professionnelle et validation par dosage urinaire	50e percentile [25e-75e percentiles] Exposés : 39 [6-354] µg/g créatinine Non-exposés : 1 [0-18] µg/g créatinine	Autres polluants chimiques, métaux lourds	Caractéristiques spermatiques	↓concentration, de la numération totale, de la vitalité et de la mobilité spermatiques
Mendiola et coll., 2010 (États-Unis)	317 hommes partenaires de femme enceinte	Dosage urinaire (prélèvement urinaire et recueil de sperme le même jour)	50e percentile [25e-75e percentiles] 1,7 [0,80-3,0] µg de BPA par l d'urine	Non décrits	Caractéristiques spermatiques	Pas d'association observée entre BPA et caractéristiques spermatiques parmi ces hommes fertiles

Étude	Population	Exposition			Paramètres de santé[a]	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Co-expositions	Estimation	
Fonction sexuelle						
Li et coll., 2010a 4 régions (Chine)	164 travailleurs exposés - travailleurs de 4 usines produisant ou utilisant du bisphénol A 386 travailleurs non exposés : travailleurs n'utilisant pas de bisphénol A, ou certains maris non-exposés de femmes travailleuses non-exposées	Intitulé du poste de travail (matrice emploi exposition) et validation par dosage urinaire	50e percentile [25e-75e percentiles] Exposés : 58 [13-467] µg/g créatinine Non-exposés : 1 [0-11] µg/g créatinine	Autres polluants chimiques, métaux lourds (13 % des sujets non exposés, 59 % des exposés)	Questionnaires sur dysfonction érectile, dysfonction orgasmique, désir sexuel, satisfaction vis-à-vis de la vie sexuelle	*Odds-ratios* (OR) associés à l'exposition au BPA : OR=3,9 (IC 95 % : 1,8-8,5) pour la difficulté à obtenir une érection >50 % des rapports ; OR=7,1 (2,9-17,6) pour le fait de rapporter des difficultés à éjaculer ; OR=3,9 (2,3-6,6) pour un niveau de satisfaction vis-à-vis de la vie sexuelle < à 10 (sur une échelle de 0 à 10) Résultats globalement inchangés après exclusion des hommes déclarant être exposés aux autres polluants chimiques et métaux lourds

Étude	Population	Exposition			Paramètres de santé[a]	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Co-expositions	Estimation	
Li et coll., 2010b (Chine)	427 travailleurs : 174 exposés et 253 non exposés (inclut les sujets de l'étude Li et coll., 2010a)	Dosage urinaire du bisphénol	Idem	Idem	Questionnaires sur dysfonction érectile, dysfonction orgasmique, désir sexuel, satisfaction vis-à-vis de la vie sexuelle	Associations monotones entre le taux de bisphénol urinaire et les différents paramètres de dysfonction sexuelle étudiés. Résultats globalement inchangés après exclusion des hommes déclarant être exposés aux autres polluants chimiques et métaux lourds. Les tendances se maintiennent (mais intervalles de confiance plus larges) quand la population est restreinte aux hommes exposés à des niveaux environnementaux (sans exposition professionnelle)

[a] E2 : œstrogène ; FAI : *Free androgen index*, correspondant au ratio entre la concentration totale de testostérone et la concentration de SHBG ; FSH : hormone folliculo-stimuline ; LH : hormone lutéinisante ; SHBG : *Sex hormone binding globulin*, T : testostérone, T4, T3 ; TSH : Hormone thyroïdo-stimuline ; LOD : *limit of detection*

Tableau 24.II : Études concernant les effets possibles de l'exposition féminine humaine au bisphénol A sur des paramètres de fertilité

Étude	Population	Exposition		Paramètres de santé[a]	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Estimation	
Fonction hormonale					
Takeuchi et coll., 2004 Tokyo (Japon)	19 femmes non obèses, 7 femmes obèses avec des cycles menstruels normaux, 7 patientes souffrant d'hyperprolactinémie (Hyper-pro), 21 femmes souffrant d'aménorrhée d'origine hypothalamique (HA) et 19 femmes avec un syndrome des ovaires polykystiques (SOP), dont 6 obèses	Dosage sérique de bisphénol A	Non obèses : 0,71±0,09 Obèses : 1,04±0,09 ($p<0,05$) Hyper-pro : 0,83±0,12 (ns) HA : 0,84±0,10 (ns) SOP (non obèses) : 1,05±0,10 ($p<0,05$) SOP (obèses) : 1,17±0,16 ($p<0,05$)	Dosage sérique de LH, FSH, E2, T totale, T libre, A, DHEAS, prolactine, Insuline Mesure de l'IMC	Association entre le taux sérique de bisphénol A de l'ensemble de la population et la T totale, T libre, A et DHEAS Étude difficile à interpréter car les facteurs de confusion propres à chaque pathologie n'ont pas été pris en compte et absence d'information sur l'échantillonage de la population
Endométriose					
Cobellis et coll., 2009 Naples (Italie)	Sur 69 femmes fertiles en consultation à l'hôpital 58 femmes souffrant d'endométriose 11 femmes non atteintes	Dosage sérique de bisphénol A	Détection chez 52 % des cas Aucune détection chez les témoins	Endométriose	Étude difficile à interpréter car les taux de détection du bisphénol A dans le sang sont faibles

Étude	Population	Exposition		Paramètres de santé[a]	Résultats et remarques
		Estimation	Niveau d'exposition	Estimation	
Itoh et coll., 2007 Tokyo (Japon)	Sur 166 femmes infertiles consultant à l'hopital 140 femmes avec un diagnostic d'endométriose	Dosage urinaire de bisphénol A	Médiane [25e–75e percentiles] Grade 0-IV : 0,80 [0,45-1,3] µg/g créatinine Grade 0-I : 0,74 [0,45-1,21] µg/g créatinine (ns) Grade II-IV : 0,93 [0,5-01,48] µg/g créatinine (ns)	Endométriose avec détermination du grade de sévérité (0 à IV)	Pas d'association entre le taux de bisphénol A urinaire et l'endométriose Étude difficile à interpréter difficile car elle comporte des limites méthodologiques
Cancer du sein					
Yang et coll., 2009 Séoul (Corée du Sud)	70 femmes avec un cancer du sein diagnostiqué 82 femmes consultant dans le même hôpital	Dosage sérique du bisphénol A	Médiane Cas : 0,61 µg/l (test de Wilcoxon, p=0,42) Témoins : 0,03 µg/l	Cancer du sein	Pas d'association entre taux de bisphénol A et survenue de cancer du sein Étude difficile à interpréter car elle comporte des limites méthodologiques
Survenue de fausses-couches					
Sugiura-Ogasawara et coll., 2005 Nagoya (Japon)	45 femmes ayant eu au moins trois fausses-couches spontanées 32 femmes n'ayant jamais accouché et sans antécédent d'infécondité	Dosage sérique du bisphénol A	Moyenne ± SD Cas : 2,59±5,23 µg/l (p=0,024) Témoins : 0,77±0,38 µg/l	Grossesses Fausses-couches spontanées	Pas d'association significative entre taux élevé de bisphénol et la survenue d'une fausse-couche selon les auteurs Étude difficile à interpréter car elle comporte des limites méthodologiques

[a] A : androstènedione ; DHEAS : déhydroépiandrostérone ; E2 : œstrogène ; IMC : Indice de masse corporelle ; FSH : hormone folliculo-stimuline ; LH : hormone lutéinisante ; SHBG : *Sex hormone binding globulin*, T : testostérone, TSH : Hormone thyroïdo-stimuline

Bibliographie

BONDE J, GIWERCMAN A, ERNSTE. Identifying environmental risk to male reproductive function by occupational sperm studies : logistics and design options. *Occup Environ Med* 1996, **53** : 511-519

BRAUN J, YOLTON K, DIETRICH K, HORNUNG R, YE X, CALAFAT A, LANPHEAR B. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1945-1952

COBELLIS L, COLACURCI N, TRABUCCO E, CARPENTIERO C, GRUMETTO L. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women.*Biomed Chromato* 2009, **23** : 1186-1190

HANAOKA T, KAWAMURA N, HARA K, TSUGANE S. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* 2002, **59** : 625-628

ITOH H, IWASAKI M, HANAOKA T, SASAKI H, TANAKA T, et coll. Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis : A cross-sectional study. *Environ Health Prev Med* 2007, **12** : 258-264

LANG IA, GALLOWAY TS, SCARLETT A, HENLEY WE, DEPLEDGE M, et coll. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 2008, **300** : 1303-1310

LI D, ZHOU Z, QING D, HE Y, WU T, et coll. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of Self-Reported Male Sexual Dysfunction. *Hum Reprod* 2010a, **25** : 519-527

LI DK, ZHOU Z, MIAO M, HE Y, QING D, et coll. Relationship between Urine Bisphenol-A (BPA) Level and Declining Male Sexual Function. *J Androl* 2010b, **31** : 500-506

LIDK, ZHOU Z, MIAO M, HE Y, WANG J, et coll. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril*. 2010c, Oct 26. [Epub ahead of print]

LONGNECKER M. Human Data on Bisphenol A and Neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 531-532

MEEKER JD, CALAFAT AM, HAUSER R. Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic. *Environ Sci Technol* 2010a, **44** : 1458-1463

MEEKER JD, EHRLICH S, TOTH TL, WRIGHT DL, CALAFAT AM, et coll. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive Toxicology* 2010b, **30** : 532-539

MEEKER JD, YANG T, YE X, CALAFAT AM, HAUSER R. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect* 2011, **119** : 252-257

MENDIOLA J, JØRGENSEN N, ANDERSSON AM, CALAFAT AM, YE X, et coll. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 1286-1291

SUGIURA-OGASAWARA M, OZAKI Y, SONTA S, MAKINO T, SUZUMORI K. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2005, **20** : 2325-2329

TAKEUCHI T, TSUTSUMI O, IKEZUKI Y, TAKAI Y, TAKETANI Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004, **51** : 165-169

WOLFF M, ENGEL S, BERKOWITZ G, YE X, SILVA M, et coll. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1092-1097

YANG M, RYU JH, JEON R, KANG D, YOOKY. Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors. *Arch Toxicol* 2009, **83** : 281-285

25
Études chez les animaux mâles

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été effectuées chez le rongeur avec essentiellement des expositions à doses faibles par voie orale. Parmi les études *in vivo* chez le rongeur, la plupart se concentrent sur l'exposition au cours de la gestation et lactation, et plus rarement sur la période péripubertaire ou adulte.

Les études prises en considération sont celles qui ont été réalisées avec des doses de BPA inférieures à la NOAEL de 5 000 µg/kg/j. En effet, ces études sont les plus proches des niveaux d'exposition humaine.

Exposition continue et chronique au travers de toutes les étapes du développement

Dans les deux études de Tyl et coll. (2002, 2008), les rongeurs sont exposés par gavage à une gamme de concentrations allant de 3 µg/kg/j à 600 000 µg/kg/j chez la souris, et de 1 µg à 500 000 µg chez le rat ; un groupe témoin positif reçoit par voie orale du 17 β œstradiol. Les parents (F0) sont exposés 8 semaines avant l'accouplement, le nombre initial d'animaux/groupe répond à l'objectif d'avoir au moins 20 femelles gravides par groupe. Il s'agit d'une exposition continue dans les deux sexes, les croisements aux générations successives sont faits avec des animaux mâles et femelles exposés pareillement. Ces deux études répondent aux critères de bonnes pratiques de laboratoires (BPL) et sont basées sur la ligne directrice 416 de l'OCDE pour les études de reprotoxicité des substances chimiques.

La conclusion générale des deux études de Tyl et coll. est que le BPA dans la large gamme de doses étudiée, et plus particulièrement aux doses compatibles avec l'exposition humaine, n'a pas d'effet sur la reproduction. On note toutefois des effets aux plus fortes doses (non pertinentes pour l'exposition humaine).

Il est à noter que les poids d'organe rapportés sont les poids bruts et non relatifs, que l'évaluation de la morphologie spermatique normale et anormale est subjective (méthode visuelle). Enfin, dans les deux études, les animaux sont alimentés avec un régime non dépourvu de phyto-œstrogènes.

L'étude récente de Kobayashi et coll. (2010) examine les effets d'une exposition au bisphénol A à faible dose sur la reproduction de deux générations de souris C57BL/6J. Les femelles gestantes F0 ont reçu une alimentation contenant de faibles doses de bisphénol A (0, 0,33, 3,3 ou 33 mg/kg de nourriture) du 6e jour de gestation au 22e jour postnatal, et les souriceaux sevrés de chaque groupe issus de F0 et F1, respectivement, ont également été nourris avec ces mêmes concentrations de bisphénol A *ad libitum* jusqu'au sacrifice. Les auteurs notent une légère augmentation de l'épididyme chez les mâles F1. Cependant, seuls les poids bruts des organes sont indiqués. Des paramètres commes le rendement de la fertilité en F1 et les pertes implantatoires sont absents. L'étude sur les spermatozoïdes (mobilité) ne semble pas avoir exploité toutes les possibilités offertes par la méthode utilisée. Globalement, cette étude au *design* intéressant révèle un certain nombre de limites méthodoloques.

Exposition pendant la période de gestation et de lactation

Quelques études récentes sont référencées pour l'analyse de l'exposition pendant cette période. Trois études sont effectuées chez le rat mais sur des lignées différentes et par gavage et deux études sont réalisées chez la souris CD-1, l'une par implant et l'autre par gavage.

Salian et coll. (2009a) utilisent la lignée de rat Holtzmann. Les doses de BPA (1,2 et 2,4 µg/kg/j) sont compatibles avec les expositions humaines. L'exposition va du 12e jour de gestation à 21 jours après la naissance des F1. Le régime est dépourvu de phyto-œstrogènes. Le Diéthylstilbestrol (DES) sert de témoin positif (10 µg/kg/j). Les rats jeunes adultes 75 jours après la naissance sont croisés avec des femelles témoins. Les mâles non exposés en F2 et F3 sont étudiés. À la génération F1, les auteurs observent une augmentation significative des pertes post-implantatoires (moins importantes que pour le DES), une diminution de la taille des portées, du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes (détermination visuelle pour les 2, dans un hémocytomètre). On note un délai significativement augmenté pour la copulation en F1. Les taux d'hormones adultes (FSH, LH, testostérone, œstradiol) sont significativement diminués (particulièrement les taux d'œstradiol). Une réduction du profil d'expression de ERβ et de AR (maximum pour ce dernier au stade VIII – androgéno-dépendant – de la spermatogenèse) au niveau testiculaire dans les 3 générations, a été observée. Le profil d'expression de ER alpha est au contraire augmenté, seulement en première génération. Ces effets sont retrouvés dans les générations suivantes non exposées issues de F1 exposées. Les auteurs concluent qu'une exposition pendant la gestation et la lactation à des doses de BPA pertinentes pour l'homme influent sur la lignée germinale mâle, conduisant à des déficiences dans la fertilité des F1 et de leurs descendants mâles même non exposés.

L'effet maintenu dans les générations suivantes (F2, F3) évoque une reprogrammation de la lignée germinale par des mécanismes (génétiques/épigénétiques) persistant au-delà de l'exposition initiale.

Chez le rat Long-Evans mâle, Howdeshell et coll. (2008) n'ont pas observé de modification de différents paramètres de reproduction et des niveaux d'hormones, après exposition avec des doses orales relativement faibles d'éthynylœstradiol (EE) de 0,05 à 1,5 µg/kg/j ou de BPA de 2, 20, 200 µg/kg/j. Les mères ont été gavées du 7e jour de gestation à 18 jours après la naissance. La distance anogénitale a été mesurée 2 jours après la naissance et la rétention des mamelons 14 jours après la naissance chez les petits mâles. La nécropsie a été effectuée 150 jours après la naissance. Le poids (relatif) des vésicules séminales avait tendance à être diminué avec une exposition au BPA à 20 µg/kg/j, les poids épididymaires avec le BPA à 2 et 20 µg/kg/j, de même que le nombre de spermatozoïdes. Il faut noter enfin que l'alimentation contenait des phytoœstrogènes.

Dans l'étude plus ancienne de Watanabe et coll. (2003), les doses utilisées sont beaucoup plus fortes. Les rates gravides (Sprague Dawley) ont été exposées au BPA par gavage avec 4 000 µg, 40 000 µg et 400 000 µg/kg du 6e jour de gestation au 20e jour après la naissance. Les concentrations de testostérone plasmatique chez les rats postpubères (63 jours après la naissance) étaient significativement augmentées dans les groupes BPA. À l'âge de 36 semaines, les concentrations hormonales avaient tendance à être augmentées selon une relation dose réponse monotone. On observe une tendance similaire pour les taux de testostérone testiculaire. Le taux d'œstradiol n'est pas modifié. Il n'y a pas d'altération des poids des testicules. Il n'y a aucun changement notable des concentrations plasmatiques de la LH et de la FSH. Les résultats suggèrent que l'exposition au BPA (à ces doses élevées) au cours de la période gestationnelle et de lactation a un effet significatif sur l'homéostasie de la testostérone chez les mâles. Le fait que la testostérone soit augmentée, et non l'œstradiol, peut suggérer une éventuelle modification de l'activité aromatase.

Chez la souris, Okada et coll. (2008) ont évalué l'effet du BPA (comparé au 17β-œstradiol) administré chroniquement avec des implants (dose totale dans le tube : 100 µg ou 5 000 µg) placés 3 jours avant le croisement avec des souris mâles. Le tube a été maintenu pendant toute la période gestationnelle et lactationnelle et la nécropsie a eu lieu au 28e jour après la naissance. Cette méthode évite la manipulation des animaux mais ne permet pas de comparaison avec une exposition orale. La plupart des souris ayant reçu le témoin positif avortaient. Le poids corporel et le poids des organes reproducteurs (testicules, épididyme et glandes annexes) dans les groupes traités n'étaient pas modifiés. Le pourcentage de tubes séminifères dans les testicules avec des spermatides matures est significativement plus faible pour le groupe 5 000 µg BPA. La testostérone tend à être augmentée dans le groupe 100 µg BPA.

D'autres auteurs (Kabuto et coll., 2004) ont étudié les modifications des capacités antioxydantes endogènes et des dommages oxydatifs dans le cerveau, le foie, les reins, les testicules chez la souris exposée au BPA (5 ou 10 µg BPA/ml d'eau de boisson) une semaine avant croisement puis du premier jour de gestation au 28e jour après la naissance, moment du sacrifice des petits. Le poids sec des

testicules est significativement diminué avec la dose de 10 µg BPA/ml. L'exposition au BPA augmente l'activité de la catalase dans le foie et de la glutathion peroxydase dans les reins. Elle augmente également le taux d'acide thiobarbiturique dans le cerveau, les reins et les testicules. L'activité catalase dans le testicule est diminuée. Ces résultats suggèrent que l'exposition gestationnelle/lactationnelle au BPA chez la souris induit un stress oxydatif et une peroxydation des tissus, conduisant notamment à une hypotrophie des testicules.

Exposition néonatale

Kato et coll. (2006) ont traité des rats mâles Sprague-Dawley du jour de la naissance au 9e jour avec le BPA par voie sous-cutanée, comparativement au 17β-œstradiol (E2) utilisé de la même manière, selon les catégories de poids de nouveau-nés. Les doses utilisées allaient de 2 µg/kg à 97 000 µg/kg en fonction de catégories de poids des rats nouveau-nés. Les nécropsies sont faites au 10e, 35e et 150e jour après la naissance. La séparation du prépuce, le taux de copulation, le taux de fécondité, l'analyse du sperme, le taux de testostérone sérique et l'expression des gènes (expression de ER et AR, et des gènes impliqués dans les voies de synthèse des hormones stéroïdes) dans les testicules ont été évalués. Seuls les animaux du groupe E2 ont des paramètres modifiés. En revanche, l'exposition au BPA n'entraînait pas d'anomalies des paramètres reproductifs ni des taux d'hormones. Il n'y a pas de modifications de l'expression des gènes dans le testicule, quelle que soit la dose de BPA.

Salian et coll. (2009b) ont analysé les mécanismes d'action du BPA sur le testicule chez le rat. Des rats mâles (Holtzmann) sont exposés par injection sous-cutanée au BPA à des doses allant de 0,6 à 10 µg/rat (100-1 600 µg/kg de poids corporel) de BPA un jour après la naissance jusqu'à 5 jours après. Le DES est utilisé comme témoin positif (1 600 µg/kg/j). Le régime est dépourvu de phyto-œstrogènes. Le protocole général, les paramètres phénotypiques étudiés et la façon de les étudier est similaire à l'étude décrite précédemment (Salian et coll., 2009a). La fertilité est évaluée et la plus faible dose de BPA efficace pouvant altérer la fertilité est déterminée. Les auteurs rapportent une baisse significative de la production de spermatozoïdes, des déséquilibres hormonaux, un temps pour la copulation plus long chez les rats exposés. Les femelles accouplées aux mâles exposés à différentes concentrations de BPA ont une augmentation significative des pertes post-implantation et une diminution de la taille des portées. La dose de 2,4 µg/rat, correspondant à 400 µg/kg de BPA, est la dose la plus faible capable d'altérer la fertilité mâle. Par des études immunohistochimiques, une réduction significative de l'expression de connexines (Cx-43) (45e et 90e jour) et une augmentation de l'expression de la N-cadhérine (45e et 90e jour) et de la zona-occludin-1 (ZO-1) (90e jour) (protéines constituant les jonctions adhérentes des cellules de Sertoli) ont été observées dans les testicules de rats exposés. De façon

intéressante, une expression altérée de Cx43 est notée dans les cellules testiculaires desquamées des rats exposés, et non dans celles des témoins. Ces perturbations pourraient être l'un des facteurs qui conduisent à des troubles de la spermatogenèse chez les animaux exposés.

Exposition pubertaire

L'hypothèse de l'effet du BPA lors d'une exposition pubertaire sur les hormones et le comportement de l'animal juvénile (37 jours après la naissance) ou adulte (105 jours après la naissance) a été testée par Della Seta et coll. (2006). Les rats (Sprague Dawley) sont exposés par voie orale en phase prépubertaire, du 23e au 30e jour après la naissance, à la dose de 40 µg/kg/j) (témoin positif : éthinylœstradiol – EE – à 0,4 µg/kg/j). L'exposition à EE modifie le schéma temporel de l'activité sexuelle des mâles, réduisant les performances chez l'adulte. Des modifications dans la même direction, mais de manière moins marquée sont observées avec le BPA. Les concentrations de testostérone sont diminuées avec le BPA chez les animaux juvéniles. Cet effet persiste chez l'adulte de manière significative uniquement dans le groupe d'animaux exposé au BPA. Les taux d'œstradiol ne sont pas modifiés.

Exposition jeune adulte et adulte

Le BPA et l'octylphénol (OP) ont été comparés sur différents événements de la reproduction après une exposition post-pubertaire (52 jours après la naissance) chez le rat mâle Wistar par injection sous-cutanée quotidienne (Herath et coll., 2004). Après 5 semaines de traitement (3 000 µg/kg), les taux de testostérone plasmatique et le nombre de spermatozoïdes épididymaires étaient significativement réduits avec BPA et OP. Les animaux exposés avaient des taux élevés de progestérone. La mobilité des spermatozoides n'était pas modifiée. Le BPA augmentait le poids de la prostate ventrale et il y avait des taux élevés de l'IGF-I. Les auteurs concluent que l'exposition du jeune adulte au BPA joue sur la production de spermatozoïdes. L'association de l'hypertrophie de la prostate ventrale avec l'IGF-I plasmatique fait évoquer un possible rôle des expositions au BPA dans les maladies de la prostate car IGF-I est impliquée dans la pathogénie des cancers de la prostate chez l'homme (Djavan et coll., 2001).

Chitra et coll. (2003) ont évalué l'effet du bisphénol A sur le système antioxydant des spermatozoïdes épididymaires de rat (Wistar). Le BPA a été administré par voie orale à des doses de 0,2, 2 et 20 µg/kg par jour pendant 45 jours. On a observé une diminution significative du poids des testicules et épididymes, et une augmentation très importante de la prostate ventrale. Le BPA

entraîne une diminution de la mobilité et du nombre de spermatozoïdes (évaluées à l'hémocytomètre) de manière dose-dépendante. Les activités de la superoxyde dismutase, catalase, glutathion réductase et glutathion peroxydase étaient diminuées tandis que les niveaux de H_2O_2 et la peroxydation des lipides étaient augmentées. Ces résultats suggèrent qu'une exposition subchronique adulte au BPA provoque un épuisement des défenses antioxydantes, qui peut aboutir à un stress oxydatif des spermatozoïdes.

Ashby et coll. (2003) ont conduit 4 études indépendantes testant des doses de 20 µg/kg, 2 000 µg/kg et 200 000 µg/kg lors d'une exposition adulte au BPA chez le rat (Sprague-Dawley) de 91 à 97 jours après la naissance avec un sacrifice au 126e jour. Les auteurs ne trouvent aucune modification significative de la production spermatique évaluée à l'hémocytomètre, contrairement aux changements dans la production spermatique rapportés dans une étude plus ancienne (Sakaue et coll., 2001) avec un protocole similaire.

En conclusion, plusieurs études récentes effectuées sur la seule période gestation/lactation et avec une exposition à des doses faibles mettent en évidence des effets sur la reproduction (modifications des taux d'hormone, du nombre et la qualité des spermatozoïdes, retard à la copulation…) (tableau 25.I). Par ailleurs, des effets retrouvés dans les générations suivantes non exposées suggèrent une action sur la lignée germinale mâle, conduisant à des déficiences dans la fertilité des F1 et de leurs descendants mâles même non exposés.

Cependant, la pertinence de ces travaux pour prédire le danger pour l'homme chez lequel l'exposition est continue, reste relative.

Tableau 25.I : Paramètres phénotypiques affectés chez l'animal mâle

Paramètres phénotypiques	Espèces/lignée	Voies/Doses (µg/kg/j)	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids testicules, poids épididymes, poids prostate, poids vésicules séminales	Souris Rat SD Souris CD-1 Rat Wistar Rat Holtzman Souris CF-1 Souris ICR	Orale : 0,2 à 5 000 SC : 100 à 3 000 Gestation/lactation/ adulte/multigénération	Vom Saal, 1998 Gupta, 2000 Ema et coll., 2001 Chitra et coll., 2003 Kawai et coll., 2003 Herath et coll., 2004 Kabuto et coll., 2004 Salian et coll., 2009 Kobayashi et coll., 2010

Paramètres phénotypiques	Espèces/lignée	Voies/Doses (µg/kg/j)	Références
Modification des paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité %	Souris Rat Holtzman Souris ICR Rat Wistar Rat SD Souris CF-1	Voie orale : 0,2 à 5 000 Implants : 1 et 60 SC : 100 à 3 000 Gestation/lactation/ puberté/adulte	Vom Saal, 1998 Ema et coll., 2001 Chitra et coll., 2003 Herath et coll., 2004 Okada et Kai, 2008 Salian et coll., 2009 Kobayashi et coll., 2010
Altérations des taux hormonaux Testostérone LH, FSH	Souris CD-1, Rat SD Rat Wistar Rat Holtzman	Orale : 2-4 000 SC : 100 à 3 000 Implants : 1 et 60 Gestation/lactation/ /puberté/adulte	Kawai et coll., 2003 Watanabe et coll., 2003 Herath et coll., 2004 Della Seta et coll., 2006 Okada et Kai, 2008 Salian et coll., 2009

SC : sous-cutanée

Bibliographie

ASHBY J, TINWELL H, LEFEVRE PA, JOINER R, HASEMAN J. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci* 2003, **74** : 129-138

CHITRA KC, LATCHOUMYCANDANE C, MATHUR PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 2003, **185** : 119-27

DELLA SETA D, MINDER I, BELLONI V, ALOISI AM, DESSÌ-FULGHERI F, FARABOLLINI F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 2006, **50** : 301-307

DJAVAN B, WALDERT M, SEITZ C, MARBERGER M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol* 2001, **19** : 225-233

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

GUPTA C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000, **224** : 61-68

HERATH CB, JIN W, WATANABE G, ARAI K, SUZUKI AK, et coll. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 2004, **25** : 163-172

HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIG HT CR, WILSON VS, RYAN BC, et coll. Gestational and Lactational Exposure to Ethinyl Estradiol, but Not Bisphenol A, Decreases Androgen-Dependent Reproductive Organ Weights and Epididymal Sperm Abundance in the Male Long Evans Hooded Rat. *Toxicol Sci* 2008, **102** : 371-382

KABUTO H, AMAKAWA M, SHISHIBORI T. Exposure to Bisphenol A During Embryonic/Fetal Life and Infancy Increases Oxidative Injury and Causes Underdevelopment of the Brain and Testis in Mice. *Life Sci* 2004, **74** : 2931-2940

KATO H, FURUHASHI T, TANAKA M, KATSU Y, WATANABE H, et coll. Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod Toxicol* 2006, **22** : 20-29

KAWAI K, NOZAKI T, NISHIKATA H, AOU S, TAKII M, KUBOC. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice : the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 175-178

KOBAYASHI K, OHTANI K, KUBOTA H, MIYAGAWA M. Dietary exposure to low doses of bisphenol A : effects on reproduction and development in two generations of C57BL/6J mice. *Congenit Anom* 2010, **50** : 159-170

OKADA A, KAI O. Effects of Estradiol-17beta and Bisphenol A Administered Chronically to Mice Throughout Pregnancy and Lactation on the Male Pups' Reproductive System. *Asian J Androl* 2008, **10** : 271-276

SAKAUE M, OHSAKO S, ISHIMURA R, KUROSAWA S, KUROHMARU M, et coll. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J Occup Health* 2001, **43** : 185-190

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Perinatal Exposure of Rats to Bisphenol A Affects the Fertility of Male Offspring. *Life Sci* 2009a, **85** : 742-752

SALIAN S, DOSHI T, VANAGE G. Neonatal Exposure of Male Rats to Bisphenol A Impairs Fertility and Expression of Sertoli Cell Junctional Proteins in the Testis. *Toxicology* 2009b, **265** : 56-67

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, THOMAS BF, KEIMOWITZ AR, et coll. Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 121-146

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD-1 (Swiss) Mice. *Toxicol Sci* 2008, **104** : 362-384

VOM SAAL FS, COOKE PS, BUCHANAN DL, PALANZA P, THAYER KA, et coll. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998, **14** : 239-260

WATANABE S, WANG RS, MIYAGAWA M, KOBAYASHI K, SUDA M, et coll. Imbalance of Testosterone Level in Male Offspring of Rats Perinatally Exposed to Bisphenol A. *Ind Health* 2003, **41** : 338-341

26
Études chez les animaux femelles

Le BPA et son conjugué (BPA-GA) sont capables de passer la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus au cours de la gestation (Nishikawa et coll., 2010). Des niveaux détectables de BPA ont été trouvés dans le placenta, le liquide amniotique et le fœtus (Moors et coll., 2006). Ces données ont fait naître l'idée que le BPA pouvait interférer avec les processus de développement de l'embryon et du fœtus et être responsable d'effets à long terme sur la reproduction du jeune ou de l'adulte.

Entre 2000 et 2005, des travaux ont montré que l'exposition pré- et post-natale était associée à une variété d'anomalies de fonctionnement des tissus reproducteurs femelles telles que : l'ouverture précoce du vagin (Honma et coll., 2002), l'avancement de l'âge la puberté (Howdeshell et coll., 1999 ; Ryan, 2006), l'altération des cycles œstriens (Markey et coll., 2003), la modification des niveaux plasmatiques de LH (hormone lutéinisante) (Rubin et coll., 2001), l'altération de l'histologie de l'utérus, du vagin (Schonfelder et coll., 2002 et 2004 ; Markey et coll., 2005), de la glande mammaire (Markey et coll., 2001), ainsi qu'une modification de la morphologie ovarienne (Markey et coll., 2003). Les effets irréversibles sur la fertilité des femelles ont été observés chez plusieurs espèces/lignées de mammifères comme les souris, les rats Sprague-Dawley (Kato et coll., 2003 ; Moral et coll., 2008), Wistar (Ramos et coll., 2003 ; Durando et coll., 2007), Fisher 344 (Khurana et coll., 2000) et le mouton (Evans et coll., 2004).

Au cours des dernières années, les expérimentations ont étudié plus spécifiquement les effets de faibles doses de BPA pendant des périodes critiques du développement de différents tissus et ont analysé les effets à long terme au moment de la puberté ou à l'âge adulte.

Dans ce chapitre seront discutés les effets portant sur les modifications de la cyclicité et du comportement sexuel ; les altérations de l'appareil génital femelle (utérus, ovaire) ; l'induction d'une puberté précoce chez les rongeurs femelles. Une première partie présente les études qui ont privilégié la période d'exposition *in utero*, la deuxième partie abordant l'exposition néonatale.

Exposition de la période gestationnelle jusqu'au sevrage

Beaucoup d'études ont examiné les effets du BPA *in vivo* chez les rongeurs (souris et rat) au cours d'expositions prénatales (*in utero*) se poursuivant au cours de la lactation (de la naissance au sevrage).

Les études de Tinwell et coll. (2002), Tyl et coll. (2002 et 2008), réalisées selon l'approche réglementaire n'ont pas mis en évidence d'effets à la suite d'expositions au BPA au cours de la gestation se poursuivant au-delà. Notons que les paramètres mesurés sont essentiellement des poids d'organes et des analyses anatomo-histopathologiques associées à des comptages (nombre de follicules dans l'ovaire, de sites d'implantation, de petits à la naissance). Aucun dosage hormonal n'a été effectué dans ces études.

Modification de la cyclicité et précocité sexuelle

Parmi les études sur rongeurs, Rubin et coll. (2001) ont montré que les descendantes femelles de rates Sprague–Dawley exposées pendant la gestation et la lactation à 1 200 µg/kg/j de BPA dans leur eau de boisson, présentent des cycles œstriens perturbés (plus longs que la normale), une diminution de l'hypersécrétion de la LH en réponse à ovariectomie, suggérant un effet neuroendocrine. La perturbation des cycles chez l'adulte a également été rapportée chez les descendants femelles de rats Sprague-Dawley ayant reçu du BPA oralement (100 µg/kg/j) pendant leur gestation (du jour 6 à 21) (Richter et coll., 2007), ainsi que chez des souris CD-1 injectées avec 500 µg/kg/j de BPA des jours 15 à 18 de la gestation (Nikaido et coll. 2004).

La survenue de la puberté chez les rongeurs femelles peut être évaluée en observant l'âge d'apparition de l'ouverture vaginale ou la première ovulation. Cette dernière peut être détectée en évaluant l'âge auquel l'épithélium vaginal devient corné, indiquant que la femelle est en chaleur (œstrus). L'âge de la puberté est lié à la croissance postnatale, à la taille du corps et aux réserves énergétiques. Des pubertés précoces ont été observées chez la souris avec des expositions maternelles à des doses variant de 2,4 à 500 µg/kg/j dans plusieurs lignées de souris ICR/Jcl, CD-1, et CF-1 (Howdeshell et coll., 1999 ; Honma et coll., 2002 ; Nikaido et coll., 2004). Cependant, une étude récente (Ryan et coll., 2010) utilisant le rat Long-Evans comme modèle rapporte que l'exposition *in utero* (à partir du jour 7) et durant la lactation (jusqu'à 18 jours postnatals) au BPA (2, 20, 200 µg/kg/j) administré oralement aux mères n'a pas d'effet sur : l'âge de l'ouverture vaginale, la fertilité, le comportement sexuel (lordose) des femelles au moment de la puberté ou à l'âge adulte.

Si la plupart des études ont été menées chez les rongeurs, il existe également quelques travaux chez le mouton. Le traitement de brebis gestantes avec 5 000 µg/kg/j de BPA délivré par injection intra-musculaire entre les jours 30–60 de gestation montrent des niveaux de LH augmentés pendant les deux premiers mois de vie postnatale, et une diminution de l'amplitude de la

décharge de LH à l'âge adulte. En revanche, l'âge d'apparition de la puberté n'est pas modifié (Savabieasfahani et coll., 2006). Des expériences conduites chez la brebis, via des injections intramusculaires de BPA (1 000 µg/kg/j) sur des animaux prépubères pendant 7 semaines avaient montré une diminution de la fréquence de la pulsatilité de LH (Evans et coll., 2004).

Ces résultats montrent que l'exposition à des doses faibles de BPA au cours d'une période de temps critique pour le développement des organes neuro-endocrines tels que l'hypothalamus et l'hypophyse pourrait altérer les paramètres reproductifs chez les mammifères prépubères ou adultes. Ces altérations causent une maturation précoce de l'axe hypothalamo-hypophysaire et parfois une puberté précoce. La pulsatilité du GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) se trouve modifiée chez les jeunes et les adultes, ce qui perturbe sévèrement la signalisation du GnRH dans l'hypophyse adulte.

Parmi les effets du BPA sur l'axe neuro-endocrine-gonade, citons ceux observés sur le comportement maternel chez la souris (Palanza et coll., 2002). Il a été montré que des souris femelles exposées au BPA (10 µg/kg/j) seulement pendant la gestation (du jour 14 au jour 18) ont des changements dans leur comportement maternel à l'âge adulte (Palanza et coll., 2002). Ces changements sont similaires à ceux observés dans le cas de traitement à l'âge adulte, consistant en un plus faible allaitement et une sortie plus fréquente du nid (Palanza et coll., 2002).

Altération de l'appareil génital femelle

Les études rapportent les effets sur l'utérus et le vagin ainsi que l'endothélium de l'endomètre.

Effets sur l'utérus et le vagin

Il existe plusieurs publications concernant l'effet du BPA sur le tractus génital femelle (utérus, vagin), que ce soit à la suite d'une exposition pendant la période gestationnelle/lactationnelle ou uniquement gestationnelle (Honma et coll., 2002 ; Markey et coll., 2003 et 2005).

Le groupe d'Ana Soto a montré chez la souris CD-1 que des changements dans la morphologie ovarienne à 3 et 6 mois sont observés après exposition *in utero* ainsi que des altérations de l'utérus et du vagin chez les descendants femelles nés de mères traitées avec 0,025 et 0,25 µg/kg/j de BPA pendant 14 jours à partir du 9e jour de gestation par injection via des pompes osmotiques (Markey et coll., 2005). Ces altérations comprennent une diminution du poids sec du vagin, une diminution du volume de l'endomètre et une expression plus importante des récepteurs ER alpha et de la progestérone dans l'épithélium de l'utérus.

Toujours chez la souris CD-1, Newbold et coll. (2009) ont étudié l'effet d'une exposition à 1, 10, 100 et 1 000 µg/kg/j de BPA pendant la gestation (de jour 9

à 16, définie comme la période d'organogenèse du tractus génital) en analysant l'histologie des ovaires et du tractus génital chez les animaux âgés de 18 mois. Le profil des lésions observées est le même que dans le cas d'une exposition postnatale à savoir une diminution du poids du vagin, du volume de l'endomètre, et une expression augmentée des récepteurs des œstrogènes (ERα) et de celui de la progestérone dans l'endomètre.

L'administration orale de 100 µg ou 50 000 µg/kg/j de BPA à des rats Sprague-Dawley femelles en gestation entraîne une diminution de l'expression protéique de ERβ mesurée au cours du cycle. Une dose élevée de 200 µg/kg/j d'éthinylœstradiol (EE2) cause le même effet (Schönfelder et coll., 2004). L'ingestion par gavage du BPA (aux deux doses mentionnées ci-dessus) et de l'EE2 entraînent un changement important dans la morphologie du vagin au cours de l'œstrus : une diminution de l'épaisseur de la couche épithéliale (Schönfelder et coll., 2002).

Enfin, l'impact de l'exposition au BPA a été analysé sur l'implantation de l'embryon et la morphologie de l'utérus chez la souris (Berger et coll., 2010). Le BPA est injecté en sous-cutanée pendant la gestation du jour 1 au jour 4 à des doses connues pour perturber la gestation (3,375, 6,75 à 10,125 mg/animal/jour équivalent à 200 mg/kg/jour et 300 mg/kg/jour, respectivement). Les perturbations de la gestation sont dues à une profonde augmentation du volume de la lumière utérine ainsi qu'à une diminution de l'expression des récepteurs alpha des œstrogènes et de la prolactine. La proportion de cellules marquées positivement pour le récepteur des œstrogènes est affectée de manière non monotone, montrant des plus hauts niveaux à 3,375 mg/animal et plus faibles niveaux à 10,125 mg/animal. Il en est de même pour les récepteurs à la progestérone.

Effet sur l'endothélium de l'endomètre

Deux études ont montré qu'une exposition pendant la période gestationnelle ou néonatale chez la souris au BPA augmente les anomalies morphologiques dans le tractus génital des femelles.

La première étude décrit l'apparition d'anomalies chez les femelles CD-1 âgées de 18 mois exposées au BPA (Newbold et coll., 2007). Cette étude rapporte que des doses de 10 à 1 000 µg/kg/j, pendant les 5 premiers jours de vie, augmentent le nombre de lésions bénignes (pré-néoplasiques) dans l'oviducte et que la dose de 100 µg/kg augmente significativement le nombre d'hyperplasies kystiques endométriales observées. Les auteurs observent également des lésions proliératrices progressives (PPL) dans l'oviducte et des kystes mésonéphrétiques (restes des canaux de Wolff) dans tous les groupes exposés. Des pathologies plus sévères de l'utérus (léiomyome, adénomyose, polypes du stroma, hyperplasie atypique) sont également retrouvées. Cette étude montre donc un ensemble de modifications histologiques, de changements bénins, pré-malins et néoplasiques du tractus génital femelle (ovaires, utérus, oviducte) obtenus après exposition au BPA.

Des lésions semblables, de type hyperplasie kystique et atypique de l'endomètre, ont également été retrouvées dans une autre étude chez des femelles âgées de 3 mois et traitées au BPA (100 et 1 000 µg/kg/j) administré pendant toute la durée de la gestation et durant la vie néonatale (Signorile et coll., 2010).

Deux travaux montrent qu'un traitement au BPA durant la vie fœtale ou néonatale peut inhiber de manière permanente l'expression de gènes *Hox* dans l'utérus du rat Wistar (Varayoud et coll., 2008) et de la souris CD-1 (Smith et coll., 2007). Les gènes *Hox* sont des morphogènes impliqués dans le développement et la différenciation de l'utérus et sont associés à la prolifération de l'endomètre. De nombreux xéno-œstrogènes peuvent altérer l'expression de ces gènes. Dans l'endomètre, les gènes *Hoxa10* et *Hoxa11* sont particulièrement importants pour la fertilité femelle, notamment pour permettre l'implantation (Cakmak et coll., 2010). Il a été démontré qu'une exposition pendant la période développementale au BPA réprime l'expression de *Hoxa10* dans l'endomètre adulte et que ceci est associé à un défaut de prolifération des cellules stromales en réponse aux hormones stéroïdes. Enfin, d'autres travaux corroborent l'effet d'une exposition pendant la gestation sur le tractus génital femelle à l'âge adulte. À de faibles doses, le BPA induit une diminution du volume, une augmentation de la prolifération et une expression accrue des récepteurs aux œstrogènes ER alpha et à la progestérone dans l'endomètre utérin de souris adulte (Markey et coll., 2005). Des doses plus fortes induisent des effets semblables chez le rat (Schonfelder et coll., 2004). Les répercussions de ces changements sur la fertilité ou des pathologies endométriales restent à étudier.

Afin de déterminer si l'exposition *in utero* de BPA entraîne une altération de l'expression de *Hoxa10* dans l'utérus, des souris ont été traitées avec 500–5 000 µg/kg BPA, du jour 9 au jour 16 de gestation (Smith et coll., 2007). Une augmentation monotone de l'expression de *Hoxa10* dans les cellules stromales de l'utérus de souris âgées de 2 et 6 semaines a été observée lorsque celles-ci ont été exposées *in utero*. Les effets du BPA sur l'expression de *Hoxa10* persistent longtemps après l'exposition *in utero* et en absence de stimulation par les œstrogènes ce qui suggère l'existence de mécanismes épigénétiques qui maintiendraient l'expression altérée, en absence du ligand, ici le BPA.

Des expériences récentes menées chez la souris traitée du jour 1 de gestation jusqu'au jour 7 après la naissance avec du BPA (100 or 1 000 µg/kg/j) montrent que les descendantes femelles après 3 mois, présentent des structures de type endométriose dans le tissu adipeux qui entoure le tractus génital. Ces structures présentent à la fois des glandes et du stroma exprimant le récepteur des œstrogènes et Hoxa-10. De plus, des ovaires kystiques, ainsi que de l'hyperplasie endométriale sont significativement plus fréquents chez les descendantes traitées en comparaison des témoins. Bien que les doses soient élevées, il est intéressant de noter que l'on peut obtenir des phénotypes d'endométriose chez une espèce dans laquelle il n'existe pas de menstruations.

Cette observation tendrait à montrer que l'endométriose est une maladie associée à une altération de développement des canaux de Müller pendant une période critique de l'embryogenèse suite à des changements de programmation génétiques ou épigénétiques (Signorile et coll., 2010).

En résumé, le mécanisme d'action par lequel l'exposition au BPA conduit à une pathologie endométriale reste à définir et nécessitera des travaux expérimentaux additionnels. Cependant, des données solides démontrent nettement une altération des gènes cruciaux pour le fonctionnement de l'endomètre lors d'une exposition développementale chez les rongeurs. Ainsi, une exposition au BPA pendant la période *in utero* et périnatale pourrait altérer de manière permanente la programmation de l'utérus et sa réponse aux hormones stéroïdes à l'âge adulte.

Effets sur l'ovaire

Il a été montré que 5 et 70 µg/kg/j de BPA entraînaient une altération de l'alignement des chromosomes au cours de la méiose des ovocytes (Hunt et coll., 2003). Ces observations conduisent à proposer que l'exposition au BPA pendant la reprise de méiose au moment de l'ovulation pourrait induire une augmentation de l'aneuploïdie, qui est une des causes majeures d'avortement spontané chez la femme (Hunt et coll., 2003). Un défaut de méiose a été observé chez les souris C57BL/6 à la suite d'une exposition maternelle de BPA par voie orale ou par injection de 20 µg/kg/j par Hunt et coll. (2003), l'effet est similaire à celui observé chez les souris C57BL/6 inactivées pour le récepteur bêta des œstrogènes (Susiarjo et coll., 2007).

Exposition néonatale

À l'intérieur de l'axe HHG (axe hypothalamo-hypophyso-gonadique), la maturation et le fonctionnement reproductif sont coordonnés par la libération du GnRH, un petit peptide produit par l'hypothalamus. La sécrétion du GnRH est pulsatile et agit sur l'hypophyse pour stimuler la synthèse et la libération des hormones gonadotropes LH et FSH (*follicle-stimulating hormone*) (Pawson et McNeilly, 2005). La libération de GnRH est contrôlée par une boucle de régulation incluant les hormones stéroïdes gonadiques. Chez les rongeurs, la différenciation sexuelle de ce circuit se met en place pendant la période néonatale, et a été montrée comme étant particulièrement sensible aux perturbations endocriniennes (Thigpen et coll., 2003 ; Howdeshell et coll., 2003).

L'équipe d'Adewale et coll. (2009) a étudié l'effet de faibles doses de BPA (50 µg/kg/jour) injectées chez le rat Long-Evans âgé de 1 à 4 jours. Les auteurs montrent l'apparition d'une puberté précoce (avancement de l'âge de l'ouverture vaginale), une modification de la morphologie ovarienne (apparition de

kystes) et de la cyclicité chez les animaux devenus adultes. Ces dysfonctionnements résultent d'une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique, notamment d'une altération du rétro-contrôle négatif par les hormones stéroïdes. Il est intéressant de noter que parmi les doses utilisées (50 µg et 50 000 µg/kg), la faible dose a l'effet le plus fort en termes d'induction de puberté précoce.

Une étude de Fernandez et coll. (2009) ciblant la période critique de différenciation de l'hypophyse (jour 13 postnatal) chez la femelle rat (Sprague-Dawley), montre que les niveaux de LH basaux et induits par le GnRH sont plus faibles chez les jeunes traitées au BPA (de jour 1 à 10) que chez les témoins. Chez les femelles adultes, traitées en période néonatale, avec le BPA (50 et 500 µg/kg), la sécrétion hypophysaire de LH induite par le GnRH *in vivo* est diminuée et la pulsatilité du GnRH est altérée.

Navarro et coll. (2009) ont montré chez le rat Wistar femelle injecté en sous-cutané avec 100 et 500 µg/animal de BPA, du jour 1 à 5 postnatal, une suppression des niveaux d'ARN messagers de KiSS-1 dans l'hypothalamus pouvant entraîner une altération du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire et de la sécrétion des hormones gonadotropes.

Toujours chez le rat Wistar, il a été montré par Monje et coll. (2009), que l'injection sous-cutanée de BPA (0,05 mg/kg/jour ou 20 mg/kg/jour) du 1er au 7e jour postnatal entraînait chez les descendantes âgées de 100 jours, une altération de la cyclicité à la dose la plus faible et une totale infertilité due à l'absence de pic ovulatoire de LH à la dose la plus forte. Par analyse en PCR quantitative, il a été montré que l'expression d'ARN de GnRH est augmentée dans l'hypothalamus des animaux ayant reçu de faibles doses et diminuée dans celui des animaux injectés avec de fortes doses ; l'épissage de l'ARN est modifié aux deux doses. Des analyses immunohistochimiques révèlent quant à elles que le récepteur alpha des œstrogènes est dérégulé dans les noyaux hypothalamiques qui régulent la cyclicité.

Une étude récente a montré chez la rate Sprague-Dawley injectée en sous-cutanée journellement avec du BPA, 500 µg/50 µl, 50 µg/50 µl, 5 µg/50 µl du jour 1 au jour 10 postnatal, une morphologie anormale de l'ovaire présentant de nombreux kystes avec la concentration la plus élevée. La morphologie des ovaires est semblable à celle observée dans les cas d'ovaires polykystiques chez la femme. À la dose de 50 µg/50 µl, les femelles ont une fertilité réduite. À forte dose, les femelles sont toutes stériles (Fernandez et coll., 2010).

En 2010, une étude menée chez le rat Wistar a montré que le BPA à forte dose (20 mg/kg/j) réduisait le pool de follicules primordiaux en stimulant leur recrutement prématuré (Rodriguez et coll., 2010). Ce n'est pas par apoptose que la réserve des follicules primordiaux est diminuée mais par activation vers les stades ultérieurs (activation de la transition primordial-primaire). C'est donc la dynamique folliculaire qui est altérée. Le BPA a été administré par injection sous-cutanée du premier au septième jour postnatal aux doses de

20 mg/kg-jour et 0,05 mg/kg-jour ; les ovaires ont été récupérés au huitième jour. Il a été également observé, à la dose la plus élevée, une augmentation de la prolifération et de l'expression du récepteur bêta des œstrogènes (ERβ) dans les cellules de granulosa des follicules primaires, secondaires et préantraux. Ces résultats suggèrent que l'activation des follicules, initiée prématurément par l'exposition au BPA, pourrait être due à un effet stimulateur médié par ER beta sur la folliculogenèse précoce. Aucun kyste n'est observé dans les ovaires, contrairement aux observations faites par Fernandez et coll., 2010.

Enfin, il a également été montré une modification du comportement sexuel. Chez le rat Wistar injecté en sous-cutané avec 5 µg/kg/jour de BPA, de 1 à 7 jours postnatals, on observe une diminution de la réceptivité sexuelle. Cette diminution s'accompagne d'une expression réduite du récepteur alpha des œstrogènes dans les noyaux médians pré optiques et ventromédians de l'hypothalamus des descendants femelles à l'âge adulte (Monje et coll., 2010). Ces résultats indiquent que le BPA peut altérer de façon permanente le comportement sexuel chez la femelle adulte de rat, et que cet effet pourrait s'expliquer par des perturbations au niveau des structures hypothalamiques œstrogenodépendantes.

En résumé, les études récentes montrent que l'exposition des rongeurs à de faibles doses pendant la période néonatale (de 1 à 10 jours), qui est une période critique pour la mise en place du système HHG dans ces espèces, entraîne des modifications de la sécrétion des hormones ou des peptides produits par l'hypothalamus et l'hypophyse. Ces modifications du niveau et de la fréquence des sécrétions hormonales perturbent la fonction de reproduction sur le long terme puisque les effets sont observés au moment de la puberté ou à l'âge adulte.

En conclusion, cette analyse chez la femelle montre que les études ne reposent ni sur les mêmes lignées d'animaux, ni sur la même fenêtre d'exposition, ni sur les mêmes modes d'administration du BPA comme chez le mâle. Certaines ne précisent pas si les aliments et la boisson des animaux sont contrôlés du point de vue de leur contamination par le BPA ou d'autres perturbateurs endocriniens.

Cependant, malgré la diversité des protocoles expérimentaux, des effets concordants existent montrant que de faibles doses de BPA pendant des périodes critiques de développement ont des effets sur l'avancement de l'âge de la puberté, des effets sur le tractus génital de la femelle, sur la fonction ovarienne, sur le comportement des rats et des souris (tableau 26.I). Pour certains de ces effets, des mécanismes épigénétiques apparaissent en cause. Ces différents effets indiquent des actions au niveau du cerveau et de son fonctionnement (récepteurs, hormones).

Tableau 26.I : Paramètres affectés dans les études chez les animaux femelles (rongeurs)

Paramètres phénotypiques	Espèces/lignée	Voies/Doses (µg/kg/j)	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids ovaires, utérus, lésions pré-néoplasiques, kystes ovariens, endométriose	Souris CD-1 Rate Sprague-Dawley Rate Long-Evans	Injection : 0,025 et 0,25 10-1 000 Gavage : 100, 50 000 Gestation/périnatal/ postnatal	Schonfelder et coll., 2004 Markey et coll., 2005 Newbold et coll., 2007 Adewale et coll., 2009 Newbold et coll. 2009 Fernandez et coll., 2010 Signorile et coll., 2010
Modification de la cyclicité	Rates Sprague-Dawley Rate Wistar Souris CD-1	Orale : 100 ; 1 200 (eau de boisson) SC : 50-500 Gestation/ Gestation-lactation	Rubin et coll., 2001 Nikaido et coll., 2004 Richter et coll., 2007 Monje et coll., 2009
Modification des follicules	Rate Wistar	SC : 20 000 postnatal	Rodriguez et coll., 2010
Puberté Ouverture vaginale	Souris ICR/Jcl, CD-1, et CF-1 Rate Long Evans	Injection : 2,4 à 500 Gestation/ postnatal	Howdeshell et coll., 1999 Honma et coll., 2002 Nikaido et coll., 2004 Adewale et coll., 2009
Altérations des taux hormonaux Œstradiol, LH, progestérone,	Rate Sprague-Dawley Rate Wistar	Orale : 50-500 ; 1 200 (eau de boisson) SC : 50-500 Gestation-lactation, postnatal/prépuberté,	Rubin et coll., 2001 Fernandez et coll., 2009 Monje et coll., 2009 Navarro et coll., 2009

De nouvelles approches commencent à être entreprises (transcriptome, protéome, métabolome, programmation épigénétique,) mettant en œuvre des méthodes plus sensibles (microarrays, quantitative RT-PCR, Chip, mesure des niveaux de méthylation...) qui permettront de détecter des variations plus fines que celles obtenues par des études fondées sur l'analyse morphologique. Elles devraient également permettre d'identifier les mécanismes altérés par le BPA au niveau cellulaire ou tissulaire qui pourront rendre compte des dysfonctionnements observés chez les animaux exposés.

Bibliographie

ADEWALE HB, JEFFERSON WN, NEWBOLD RR, PATISAUL HB. Neonatal Bisphenol-A Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology Without Impairing Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons. *Biol Reprod* 2009, **81** : 690-699

BERGER RG, FOSTER WG, DE CATANZARO D. Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice. *Reprod Toxicol* 2010, **30** : 393-400

CAKMAK H, TAYLORHS. Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis : the role of progesterone-hox gene interactions. *Semin Reprod Med* 2010, **28** : 69-74

DURANDO M, KASS L, PIVA J, SONNENSCHEIN C, SOTO AM, et coll. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 80-86

EVANS NP, NORTH T, DYE S, SWEENEY T. Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* 2004, **1** : 61-73

FERNANDEZ M, BIANCHI M, LUX-LANTOS V, LIBERTUN C. Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 757-762

FERNANDEZ MO, BOURGUIGNON N, LUX-LANTOS V, LIBERTUN C. Neonatal Exposure to Bisphenol A and Reproductive and Endocrine Alterations Resembling the Polycystic Ovarian Syndrome in Adult Rats. *Environ Health Perspect* 2010, epub

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

HOWDESHELL K, HOTCHKISS A, THAYER K, VANDENBERGH J, VOM SAAL F. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999, **401** : 763-764

HOWDESHELL KL, PETERMAN PH, JUDY BM, TAYLOR JA, ORAZIO CE, et coll. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1180-1187

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

KATO H, OTA T, FURUHASHI T, OHTA Y, IGUCHI T. Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 2003, **17** : 283-288

KHURANA S, RANMAL S, BEN-JONATHAN N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens : delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 2000, **141** : 4512-4517

MARKEY C, COOMBS M, SONNENSCHEIN C, SOTO A. Mammalian development in a changing environment : exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev* 2003, **5** : 67-75. Erratum in : *Evol Dev* 2004, **6** : 207. Dosage error in article text.

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

MARKEY CM, WADIA PR, RUBIN BS, SONNENSCHEIN C, SOTO AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenostrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 2005, **72** : 1344-1351

MONJE L, VARAYOUD J, MUNOZ-DE-TORO M, LUQUE EH, RAMOS JG. Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reprod Toxicol* 2009, **28** : 435-442

MONJE L, VARAYOUD J, MUÑOZ-DE-TORO M, LUQUE EH, RAMOS JG. Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. *Reprod Toxicol* 2010 **30** : 625-634

MOORS S, DIEL P, DEGEN GH. Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats after single i.v. application. *Arch Toxicol* 2006, **80** : 647-655

MORAL R, WANG R, RUSSO IH, LAMARTINIERE CA, PEREIRA J, et coll. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol* 2008, **196** : 101-112

NAVARRO VM, SANCHEZ-GARRIDO MA, CASTELLANO JM, ROA J, GARCIA-GALIANO D, et coll. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 2009, **150** : 2359-2367

NEWBOLD RR, JEFFERSON WN, PADILLA-BANKS E. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* 2007, **24** : 253-258

NEWBOLD RR, JEFFERSON WN, PADILLA-BANKS E. Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 879-885

NIKAIDO Y, YOSHIZAWA K, DANBARA N, TSUJITA-KYUTOKU M, YURI T, et coll. Effects of maternal xenœstrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 803-811

NISHIKAWA M, IWANO H, YANAGISAWA R, KOIKE N, INOUE H, et coll. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ Health Perspect* 2010, Ahead of print 09 April 2010

PALANZA , HOWDESHELL KL, PARMIGIANI S, VOM SAAL FS. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 2002, **110** (Suppl 3) : 415-422

PAWSON A, MCNEILLY A. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005, **88** : 75-94

RAMOS JG, VARAYOUD J, KASS L, RODRIGUEZ H, COSTABEL L, et coll. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 2003, **144** : 3206-3215

RICHTER CA, BIRNBAUM LS, FARABOLLINI F, NEWBOLD RR, RUBIN BS, et coll. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007, **24** : 199-224

RODRÍGUEZ HA, SANTAMBROSIO N, SANTAMARÍA CG, MUÑOZ-DE-TORO M, LUQUE EH. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 2010 Aug 6. [Epub ahead of print]

RUBIN BS, MURRAYMK, BAMASSA DA, KING JC, SOTO AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 675-680

RYAN BC, VANDENBERGH JG. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav* 2006, **50** : 85-93

RYAN BC, HOTCHKISS AK, CROFTON KM, GRAY LE, JR. 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 LE Rats. *Toxicol Sci* 2010, **114** : 133-148

SAVABIEASFAHANI M, KANNAN K, ASTAPOVA O, EVANS NP, PADMANABHAN V. Developmental programming : differential effects of prenatal exposure tobisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology* 2006, **147** : 5956-966

SCHÖNFELDER G, FLICK B, MAYR L, TALSNESS C, PAUL M, CHAHOUD I. In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* 2002, **4** : 98-102

SCHÖNFELDER G, FRIEDRICH K, PAUL M, CHAHOUD I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia* 2004, **6** : 584-594

SIGNORILE PG, SPUGNINI EP, MITA L, MELLONE P, D'AVINO A, et coll. Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen Comp Endocrinol* 2010, **168** : 318-325

SMITH CC, TAYLOR HS. Xenœstrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. *FASEB J*2007, **21** : 239-246

SUSIARJO M, HASSOLD TJ, FREEMAN E, HUNT PA. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 2007, **3** : e5

THIGPEN JE, HASEMAN JK, SAUNDERS HE, SETCHELL KDR, GRANT MG, FORSYTHE DB. Dietary phytœstrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp Med* 2003, **53** : 477-485

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

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

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 2008, **104** : 362-384

VARAYOUD J, RAMOS JG, BOSQUIAZZO VL, MUNOZ-DE-TORO M, LUQUE EH. Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 2008, **149** : 5848-5860

27
Effets cellulaires et tissulaires

Au cours des dernières années, il a été rapporté une association entre exposition pendant la période gestationnelle ou néonatale au BPA et des pathologies incluant des lésions pré-néoplasiques et néoplasiques de différents tissus tels que la glande mammaire (Durando et coll., 2007 ; Murray et coll., 2007), la prostate (Ho et coll., 2006), ou des lésions d'endométriose (Signorile et coll., 2010).

Effets sur les cellules de la prostate

De nombreux travaux ont démontré l'effet de diverses substances à activité œstrogénique sur le développement de la prostate. Il existe une littérature globalement concordante indiquant que l'éthynil œstradiol, l'œstradiol, le diéthylstilbestrol (DES) ou le méthoxychlore, administrés *in utero* à de faibles doses, peuvent augmenter de manière permanente la taille de la prostate chez les rongeurs.

Une étude expérimentale chez les rongeurs suggère que le BPA pourrait avoir un effet identique (Ho et coll., 2006). Cependant, les données concernant ce produit apparaissent plus confuses, parfois contradictoires du fait de la multiplicité des protocoles d'administration, des critères étudiés et des doses employées (Milman et coll., 2002).

Ainsi, plusieurs auteurs ne retrouvent pas d'effet sur la taille de la prostate en réponse au BPA. Par exemple, deux études de Tyl (2002 et 2008) conduites sur 3 générations (avec des doses entre 3 µg/kg/j et 600 mg/kg/j) chez le rat et sur deux générations chez la souris et analysant les effets d'un large éventail de doses de BPA administré oralement ne rapportent aucun effet sur le poids de la prostate.

Par ailleurs, il n'y a pas de preuve qu'une augmentation du poids soit un indice de transformation chez le rongeur. Une explication possible semble être que l'administration de fortes doses de substances œstrogéniques inhibe globalement la croissance de la prostate et que le BPA semble avoir des effets différents en fonction des lobes de la prostate (Ogura et coll., 2007). Il est cependant difficile d'établir une correspondance entre l'anatomie lobaire de la prostate de la souris et l'anatomie zonale de la prostate humaine.

L'étude fondatrice qui amena le questionnement des effets du BPA sur le développement de la prostate a été celle de Nagel et coll. (1997). Les auteurs y rapportent les effets de l'administration par voie orale de 2 000 et 20 000 µg/kg/j de BPA *in utero* et observent à l'âge adulte une nette augmentation du poids de la prostate. Cette étude apparemment claire ne décrit cependant pas l'histologie des tissus prostatiques. Plus récemment, il a été suggéré que de faibles doses de BPA peuvent augmenter l'expression du récepteur aux androgènes (AR) dans la prostate fœtale murine (Richter et coll., 2007). Un tel mécanisme est concordant avec les effets d'autres substances œstrogéniques et expliquerait un accroissement de taille de la prostate dont la croissance est régulée par les androgènes. Par la suite, des travaux utilisant des doses plus faibles de BPA (10 à 20 µg/kg/j) pendant la vie fœtale ou néonatale rapportent des effets permanents (persistants chez l'adulte) sur la prostate sans modification du poids de celle-ci. Ainsi le traitement de souris *in utero* induit l'expression anormale de la cytokératine 10 (CK10) dans l'épithélium prostatique de mâles adulte (Ogura et coll., 2007). Les mêmes auteurs rapportent un effet semblable s'accompagnant d'une désorganisation de l'épithélium (métaplasie squameuse) à l'âge adulte et dans un modèle de culture d'organe. Le BPA semble donc agir directement sur la prostate et lorsque l'exposition a lieu au cours de la vie fœtale, l'effet apparaît comme permanent. Une autre étude indique qu'une exposition néonatale au BPA chez le rat altère définitivement l'expression d'une trentaine de gènes par des mécanismes impliquant la méthylation de l'ADN (Ho et coll., 2006). Les auteurs détaillent notamment que le BPA maintient définitivement l'expression de la phosphodiestérase 4D (PDE4D), une enzyme impliquée dans la dégradation de l'AMPc, en bloquant la méthylation du promoteur de ce gène. L'exposition néonatale au BPA pourrait donc altérer la mémoire épigénétique de la prostate.

De manière encore plus frappante, les mêmes auteurs décrivent l'apparition de lésions précancéreuses, ou néoplasie prostatique intra-épithéliale (PIN), chez des rats traités au BPA durant la vie néonatale puis traités ensuite à l'âge adulte par des implants d'œstradiol et de testostérone. Chez ces animaux, on observe une dysplasie sévère et la survenue d'adénome. La période néonatale chez le rat semble donc être une fenêtre critique pendant laquelle le BPA pourrait définitivement altérer la programmation de la prostate et ainsi prédisposer à la survenue de lésions pré-cancéreuses dans le cas d'une perturbation additionnelle à l'âge adulte.

L'existence de mutations dans le gène codant pour le récepteur aux androgènes pourrait être un mécanisme de sélection de cellules tumorales prostatiques et constitue un facteur de risque. Dans ce cadre, il est à noter que le BPA pourrait stimuler la progression de tels cancers. En effet, une étude rapporte qu'à de faibles doses (1nM), le BPA stimule spécifiquement la prolifération de cellules tumorales prostatiques (LNCaP) portant la mutation AR – T877A (Hess-Wilson et coll., 2007).

Effets sur les cellules mammaires

Le développement de la glande mammaire implique deux grandes étapes (pendant la vie périnatale, puis à la puberté) de croissance et de ramifications des canaux épithéliaux qui vont envahir le « coussin adipeux » avoisinant (stroma). Ces structures épithéliales contiennent deux couches de cellules différentes : les cellules basales (myo-épithéliales) à proximité du stroma mammaire et les cellules luminales à activité sécrétoire. Pendant la gestation, un tissu sécrétoire se forme. Le cancer du sein est le premier cancer de la femme mais son étiologie est encore mal connue. La grande majorité des cancers du sein sont des cancers canalaires *in situ*. Les carcinomes *in situ* (CIS) mammaires sont œstrogéno-dépendants (dans le cas général, ceux-ci expriment ERα ; leur croissance est alors stimulée par les œstrogènes ou parfois peut être inhibée par le tamoxifène).

De nombreux travaux indiquent de manière cohérente qu'une exposition développementale (fœtale ou périnatale) au BPA modifie l'architecture de la glande mammaire à l'âge adulte chez les rongeurs. Chez le rat et chez différentes lignées de souris, de faibles doses de BPA (2,5 et 25 µg/kg/j) administrées *in utero* augmentent la densité, la ramification et le nombre de canaux et d'alvéoles et induisent une hyperplasie des canaux terminaux. Il est à noter que ces structures sont à l'origine des CIS mammaires chez le rat et l'homme. Ces travaux indiquent donc qu'il pourrait exister un risque accru de tumeurs mammaires. Des doses plus fortes (250 µg/kg/j) *in utero* chez le rat peuvent induire directement l'apparition de lésions cancéreuses de type CIS à la puberté et l'âge adulte (Murray et coll., 2007). Ces CIS induits à fortes doses et les zones hyperplasiques observées dans les canaux épithéliaux à plus faibles doses sont caractérisés par une forte activité proliferatrice et l'expression du récepteur aux œstrogènes (ERα). L'exposition au BPA au cours du développement peut donc induire l'apparition de lésions pré-néoplasiques ou la transformation néoplasique de la glande mammaire du rat.

De manière intéressante, ce processus a été détaillé à plusieurs étapes. À court terme, en fin de vie fœtale, les premiers effets morphologiques du BPA sur la glande mammaire sont déjà visibles et ce, même à de faibles doses (0,25 µg/kg/j). À ce stade, le BPA accélère la maturation du coussin adipeux et retarde la formation de la lumière dans les canaux (Vandenberg et coll., 2006). Ces effets sont reliés à une modification des taux d'apoptose dans les deux compartiments (stroma et épithélium). Au moment de la puberté, les effets morphologiques apparaissent plus subtils mais la sensibilité de la glande mammaire à l'œstradiol est nettement augmentée et une diminution de l'apoptose épithéliale et stromale a également été rapportée (Munoz-de-Toro et coll., 2005 ; Durando et coll., 2007 ; Wadia et coll., 2007). Il est donc suggéré que l'exposition aux hormones ovariennes à partir de la puberté participe au développement des lésions observées plus tard dans les glandes mammaires exposées au BPA pendant la vie fœtale. À l'âge adulte, toutes les études rapportent une augmentation

des structures terminales des canaux (Markey et coll., 2001 ; Munoz-de-Toro et coll., 2005 ; Moral et coll., 2008 ; Vanderberg et coll., 2008) pour des doses variables (de 2,5 à 250 µg/kg/j *in utero*). Une hyperplasie de ces structures est également décrite (Murray et coll., 2007).

Enfin, une étude conduite chez le rat démontre qu'une exposition prénatale à de faibles doses de BPA (25 µg/kg) augmente la susceptibilité de la glande mammaire adulte à un agent carcinogène. Bien que conduite sur un effectif limité (n=18), cette étude rapporte l'apparition de CIS dans les canaux mammaires en réponse à une dose considérée comme sub-carcinogénique de N-nitroso-N-methylurée (NMU) uniquement chez les animaux traités au BPA *in utero* (Durando et coll., 2007). De même, il a été montré un rôle amplificateur du BPA dans l'apparition de tumeurs mammaires suite à une exposition à un agent cancérogène, le diméthylbenzanthracène (DMBA). Cette étude effectuée chez le rat montre que les femelles dont la mère a été traitée avec du BPA à 25 µg/kg/jour ou 250 µg/kg/jour, du jour 2 au jour 20 postnatal (pendant toute la lactation) ont plus de tumeurs mammaires (à 50 jours postnatals) lorsqu'elles reçoivent une administration de DMBA (30 000 µg/kg) (Jenkins et coll., 2009). Les effets augmentent en fonction de la dose de BPA. Cependant les effectifs sont faibles (inférieurs à 10) et ce type d'expérience mériterait d'être validée sur un plus grand nombre d'animaux.

Des travaux récents menés chez des rates gestantes exposées oralement au BPA (25, 250 µg/kg/j) du jour 10 au jour 21 post-conception ont montré des variations au niveau des protéomes mammaires des descendantes femelles âgées de 21 et 50 jours. L'analyse protéomique a révélé 21 protéines différentiellement exprimées entre les animaux exposés et les témoins. Les résultats ont été confirmés par Western-blot pour certaines d'entre elles. La surexpression de la vimentine, de phospho-AKT, c-Raf, phospho-ERKs-1 et 2 a été associée à des processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation ou encore la tumorigenèse comme les membres des familles Raf et ERK. Ces effets pourraient potentiellement augmenter la susceptibilité à la cancérisation des cellules mammaires. (Betancourt et coll., 2010).

Enfin, une étude menée sur une lignée de cellules de cancer du sein démontre que de faibles doses de BPA (0,1 nM) protègent ces cellules cancéreuses de divers agents chimiothérapeutiques (Lapensée et coll., 2009). Ainsi le BPA pourrait être impliqué à la fois dans la survenue et dans la progression des cancers du sein. Dans ces travaux, les auteurs observent que le BPA augmente l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que les facteurs de la famille de Bcl2. Par ailleurs, une autre étude renforce l'idée que le BPA pourrait contribuer à la progression de cancer du sein (Buteau-Lozano et coll., 2008). Dans cette étude, le BPA augmente de façon concentration-dépendante l'expression du VEGF dans une lignée de cellules dérivées de cancer du sein, or le VEGF est un facteur connu pour promouvoir la néo-angiogenèse dans diverses tumeurs.

En résumé, de nombreux travaux démontrent que l'exposition au BPA durant la vie fœtale pendant l'organogenèse mammaire peut modifier le développement

de cet organe, augmenter sa sensibilité aux œstrogènes à la puberté et conduire à l'apparition de lésions pré-néoplasiques. Notons que ces lésions ne mènent pas obligatoirement à la survenue d'un cancer mais créeraient un état permissif qui pourrait conduire à un cancer. Il s'agit donc d'une augmentation du risque de développer un carcinome qui pourrait être aggravé par d'autres facteurs à l'âge adulte (vieillissement ou exposition à des agents cancérogènes). Un des mécanismes par lesquels le BPA pourrait modifier la susceptibilité aux cancérogènes impliquerait un changement global de l'expression des gènes dans la glande mammaire. Le plus fort changement dans la signature génomique en réponse à une exposition fœtale à de faibles doses de BPA aurait lieu autour de la puberté (Moral et coll., 2008). L'origine, stromale ou épithéliale, de ces altérations apparaît encore incertaine et les mécanismes mal compris. Le BPA agit-il via les récepteurs aux œstrogènes ? Le développement de modèles murins (souris transgéniques) pour étudier la réponse de la glande mammaire au BPA devrait permettre d'identifier prochainement les récepteurs impliqués. Bien que les données chez les rongeurs apparaissent globalement convaincantes, il n'y a, à ce jour, aucune étude qui démontre un effet développemental du BPA chez l'être humain. Le développement de ce type de tumeurs semble cependant similaire d'un point de vue histologique.

Soulignons ici, la ressemblance du cancer du sein et de celui de la prostate, évoquée précédemment. Les deux sont majoritairement issus de carcinomes et sont hormono-dépendants. Tous deux semblent pouvoir être induits par une altération de la programmation développementale de l'organe par le BPA et celle-ci augmenterait la probabilité de transformation néoplasique en réponse à une agression carcinogénique à l'âge adulte.

Effets sur les cellules de l'endomètre

Effet sur l'endothélium de l'endomètre

L'endomètre est la muqueuse de l'utérus. Ce tissu richement vascularisé recouvre la paroi interne de l'utérus et se développe à chaque cycle au cours de la vie fertile pour éventuellement permettre l'implantation de l'embryon. La croissance de l'endomètre est sous le contrôle des hormones stéroïdes ovariennes ce qui fait de ce tissu une cible potentielle pour les perturbateurs endocriniens. Lors de la grossesse, l'endomètre s'épaissit et participe à la formation du placenta. En absence d'implantation, l'endomètre se desquame ce qui produit alors les menstruations. Le réseau vasculaire de l'endomètre doit donc se renouveler à chaque cycle menstruel. Les cellules endothéliales qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins contrôlent le développement et le remodelage du réseau vasculaire.

Deux études de la même équipe se sont intéressées aux effets du BPA sur les cellules endothéliales de l'endomètre humain (Bredhult et coll., 2007 et

2009). Il a ainsi été démontré qu'une exposition aiguë à de fortes doses de BPA (100 µM) diminue la prolifération et la viabilité de ces cellules en culture. L'analyse du profil d'expression génique des cellules exposées au BPA révèle une forte diminution de plusieurs gènes impliqués dans la division cellulaire (complexe kinétochorien, attachement au centromère, *chromosomal passenger complex*). Cette étude (Bredhult et coll., 2009) suggère donc que le BPA pourrait perturber une fonction majeure pour l'endomètre, l'angiogenèse. Bien que les données produites par cette équipe apparaissent cohérentes, les doses utilisées dépassent de loin les niveaux retrouvés dans le sang en population générale. Cependant, il est à noter que l'effet inhibiteur de la prolifération a également été obtenu avec des doses plus faibles (10 nM) et que le modèle *in vitro* d'exposition aiguë est difficilement comparable avec une exposition chronique à de faibles doses (Bredhult et coll., 2007).

Par ailleurs, un travail récent utilisant les cellules Ishikawa, un modèle de cellule humaine endométriale (lignée cancéreuse), montre que l'exposition de ces cellules à 100 µM de BPA modifie profondément leur signature transcriptomique dès 8 heures (Naciff et coll., 2010). Parmi les gènes régulés, plusieurs semblent pouvoir être utilisés comme les témoins d'une signature œstrogénique puisqu'ils sont également régulés par l'ethinyl œstradiol dans ces cellules et dans l'utérus de rat *in vivo*. De manière surprenante, l'expression de plusieurs gènes est également modifiée par des doses de l'ordre du nanomolaire (1 nM) sous le seuil estimé d'éventuels effets œstrogéniques du BPA.

Association avec l'endométriose

L'endométriose est une pathologie fréquemment associée à des défauts de fertilité. Elle est caractérisée par le développement de tissus endométriaux en dehors de la cavité utérine. Ces tissus s'implantent couramment dans la cavité péritonéale, au niveau de l'ovaire. La fréquence de cette pathologie est difficile à déterminer car elle nécessite une laparoscopie mais on la retrouve dans environ 40 % cas de consultation pour des problèmes de fertilité féminine. L'étiologie de cette pathologie est encore peu comprise.

Une étude récente (Signorile et coll., 2010) démontre une augmentation de la fréquence d'apparition de structures semblables à de l'endométriose dans le tissu adipeux entourant le tractus génital des souris femelles dès 3 mois. Ces structures expriment ER et Hoxa10 et s'accompagnent d'hyperplasies endométriales. Dans ce travail, les souris BALBC ont été exposées au BPA à de fortes doses injectées en sous-cutanée (100 et 1 000 µg/kg/j) dès le premier jour de la gestation jusqu'au 7e jour postnatal. L'occurrence de tissus de type endométriaux en dehors du tractus femelle a été démontrée par une approche histologique. Ces structures de type glande ou stroma endométrial évoquant une endométriose ont été observées dans 13 femelles traitées sur 40 alors qu'une seule femelle parmi les 20 témoins présentait des structures analogues. Du BPA (libre) a été retrouvé dans le foie de toutes les femelles traitées

(mères) et de leur descendance sans qu'il n'y ait de corrélation avec la survenue d'une pathologie semblable à l'endométriose.

En résumé, bien que les tissus endométriaux soient très sensibles aux œstrogènes et à la progestérone, il existe à l'heure actuelle peu d'études convaincantes démontrant un effet du BPA sur ce tissu chez l'être humain aux doses compatibles à celles retrouvées dans l'environnement. Un seul travail expérimental chez la souris propose qu'une exposition au BPA pendant le développement puisse induire la survenue de cette pathologie. Cette donnée est originale car elle laisse à penser qu'une perturbation du développement est à l'origine de la pathologie et non que celle-ci se développe à l'âge adulte au moment du fonctionnement cyclique de l'endomètre. Cette étude nécessite d'être confirmée sur un effectif plus large et le mécanisme d'action d'être identifié avant de pouvoir certifier l'existence d'un lien causal entre exposition fœtale au BPA et endométriose.

Si le lien entre exposition à des faibles doses de BPA et une pathologie endométriale reste à établir, des données solides démontrent nettement une altération des gènes cruciaux pour le fonctionnement de l'endomètre lors d'une exposition développementale chez les rongeurs. Ainsi, une exposition au BPA pendant certaines périodes clés pourrait altérer de manière permanente la programmation de l'utérus et sa réponse aux hormones stéroïdes à l'âge adulte.

Effets sur les cellules de la granulosa

L'unité fonctionnelle de l'ovaire est le follicule qui est composé de cellules somatiques et de l'ovocyte. La granulosa est une couche de cellules folliculaires granuleuses entourant l'œuf et la cavité liquidienne du follicule ovarien qui est responsable de la sécrétion de la progestérone durant la deuxième moitié d'un cycle ovarien (corps jaune périodique) ou durant les 4 premiers mois de la grossesse (corps jaune gravidique). Durant la première partie du cycle, les cellules de la granulosa se multiplient pour former plusieurs dizaines de couches autour de l'ovocyte. Dans leur épaisseur se créent des cavités remplies de liquide folliculaire. Par confluence, elles donnent une cavité unique, l'antrum, alors que l'ovocyte entouré d'une seule couche cellulaire (future corona radiata) est rejeté en périphérie.

Chez le rat Sprague-Dawley, Zhou et coll. (2008) ont développé des cultures primaires à partir de femelles immatures (25 jours). Deux types de cellules ont été étudiés, les cellules T-I (*rat ovarian theca-interstitial cells*) et les cellules de la granulosa (à partir de femelles non stimulées). Les auteurs ont montré que le BPA entraîne des perturbations de l'expression des enzymes clés de la stéroïdogenèse. Sur les cellules de la thèque, on constate une augmentation de testostérone, d'ARNm de P450c17 tandis que P450SCC diminue. Sur les

cellules de la granulosa, l'œstradiol et la prégnènolone augmentent, l'ARNm de la P450 aromatase diminue à fortes doses. Le BPA pourrait induire une hyperandrogénie, et l'on sait que cette anomalie est impliquée dans l'apparition du syndrome des ovaires polykystiques (PCOS).

Une équipe japonaise a étudié l'effet de faibles concentrations de BPA (100 fM-100 µM) sur des cellules de granulosa issues de souris B6C3F1 en culture pendant 24 et 72 h. Ils montrent que le BPA agit sur la viabilité de ces cellules de façon dépendant de la concentration et du temps (Xu et coll., 2002). Le marquage des cellules apoptotiques par la méthode Tunel (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) révèle que le BPA augmente l'apoptose des cellules de la granulosa et les analyses effectuées par cytométrie en flux révèlent un arrêt de la transition G2-M du cycle cellulaire. Le BPA augmente l'expression de Bax et de manière concomitante diminue l'expression de Bcl2 à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine.

Grasselli et coll. (2010) ont montré sur des cultures primaires de cellules de granulosa prélevées à partir d'ovaires de truies collectés à l'abattoir, incubées avec 0,1, 1 ou 10 µM pendant 48 h, que le BPA à toutes les concentrations testées inhibe la production de progestérone et perturbe la stéroïdogenèse ovarienne. Le BPA entre 1 et 10 µM stimule la sécrétion de VEGF dans les cellules de granulosa porcines impliqué dans le processus angiogénique, la promotion de la néovascularisation et la modification de la perméabilité vasculaire et pourrait ainsi intervenir dans le *timing* de la formation de l'antrum. Bien que ces effets soient observés sur du court terme (48 h), ils décrivent un autre mode d'action possible du BPA à savoir une action sur le processus de la vascularisation du follicule.

Enfin chez l'Homme, Kwintkiewicz et coll. (2010) ont développé un modèle *in vitro* à partir de cellules primaires de granulosa récupérées lors de fécondation *in vitro* ou de lignées cellulaires KGN (issus de granulosa) traitées avec FSH, BPA, FSH+BPA, ainsi que des cellules KGN transfectées avec le récepteur PPAR gamma. Les auteurs montrent que le BPA affecte la sécrétion d'œstradiol et l'expression des facteurs de transcription IGF1, SF1, GATA4 ainsi que l'aromatase en réponse à FSH. Ils observent une sur-expression de PPAR gamma. Les effets de la sur-expression de PPAR gamma dans les cellules KGN sont similaires à ceux observés avec le BPA. Les auteurs en concluent que les effets du BPA passeraient par le récepteur PPAR gamma et que les effets inhibiteurs du BPA sur la sécrétion E2 (stimulée par FSH) dans les cellules de granulosa humaines sont médiées par la surexpression de PPAR gamma.

Effets sur les cellules du testicule

Des effets du BPA ont été rapportés dans des lignées ou culture de cellules primaires correspondant aux principaux types cellulaires du testicule : cellules

germinales, cellules de Leydig et cellules de Sertoli. Bien que s'appuyant sur des lignées cellulaires, ces travaux permettent actuellement de proposer des pistes mécanistiques pour expliquer les effets du BPA.

Les séminomes sont des tumeurs que l'on pense d'origine germinale, probablement issues des gonocytes du testicule fœtal, dont la morphologie est voisine. Le BPA pourrait exercer des effets via un mécanisme indépendant de ER nucléaires sur les cellules de séminome (JKT1). L'étude récente de Bouskine et coll. (2009) a montré que des niveaux de BPA très faibles (10^{-12} M) peuvent augmenter la prolifération de lignées cellulaires de séminome via un mécanisme faisant intervenir un récepteur membranaire des œstrogènes couplé à une protéine G « *membrane G-protein-coupled estrogen receptor* ». Dans une autre lignée de cellules germinales (cellules GC1), Ooeh et coll (2005) tracent un lien intéressant entre l'exposition au BPA et le stress oxydatif. Dans cette lignée, le BPA (100 µM) induit la production de radicaux libres de l'oxygène. Cet effet du BPA ne semble pas spécifique des cellules germinales, mais de tels radicaux, susceptibles de générer un stress génotoxique, sont particulièrement à risque dans les cellules germinales connues pour leur grande sensibilité envers ce type de stress.

Dans une lignée de cellules de Leydig murines (K28), le BPA à faibles doses (1 à 10 nM) induit l'expression de NR4A1, un facteur de transcription (Song et coll., 2002) dès 30 minutes. Dans un modèle de cultures de cellules somatiques issues de testicules fœtaux de souris à 12,5 jpc, l'équipe de M. de Felici (La Sala et coll., 2010) a démontré que 25 µM de BPA sont capables d'induire l'expression de la luciférase sous le contrôle d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Ces auteurs ont également démontré que parmi cette population de cellules, les cellules de Leydig fœtales représentaient la majorité des cellules exprimant ERα.

Bien qu'encore imparfait, ce modèle est un des premiers ayant mesuré l'effet œstrogénique du BPA directement au sein des cellules de Leydig fœtales.

Dans une lignée de cellules de Sertoli (SerW3), le BPA réduit l'expression de l'occludine, de la N-cadhérine et de la connexine 43, ce qui laisse supposer que le BPA pourrait perturber la barrière hématotesticulaire (Fiorini et coll., 2004). Des données similaires ont été obtenues avec des cellules de Sertoli de rat en culture primaire (Li et coll., 2009). En culture, le BPA (200 µM) perturbe les jonctions serrées entre les cellules de Sertoli, ce qui correspond aux effets décrits par les mêmes auteurs sur la barrière hématotesticulaire *in vivo* chez le rat immature (Li et coll., 2009). En revanche, chez le rat adulte ces effets n'ont pas été observés. Plus récemment, la même équipe (Li et coll., 2010) a détaillé les effets du BPA (200 µM, 24 h) dans un modèle de barrière hématotesticulaire à l'aide de cultures primaires de cellules de Sertoli de rat. Dans ce modèle, le BPA perturbe transitoirement la barrière hématotesticulaire ; cet effet est réversible dès 24 h après l'arrêt du traitement. L'intégrité des jonction serrées est fortement diminuée par le BPA, et la production ou la

localisation de protéines associées avec les principales composantes de la barrière hématotesticulaire (jonctions serrées, jonctions gap, spécialisations ectoplasmiques) telles que l'occludine, JAM-A, la N-cadherine, l'α- et la β-cathenine et la connexine 43, sont altérées. Les auteurs rapportent également une activation de la voie ERK (phosphorylation de ERK1/2) induite par le BPA dans ce modèle et qui pourrait donc être un des mécanismes impliqués dans l'action du BPA sans pour autant que cela n'ait été formellement prouvé.

En conclusion, chez le rat ou la souris, plusieurs effets résultant d'une exposition au BPA au cours de la période fœtale ou périnatale témoignent d'une altération durable de la programmation de différents tissus, pouvant se traduire par la survenue de pathologies à l'âge adulte, tels les cancers de la prostate, du sein ou l'endométriose. De tels travaux bien qu'encore peu nombreux changent considérablement la façon d'appréhender la mesure des effets toxiques du BPA qui sera évidemment longue et complexe à prendre en compte chez l'être humain. Il est donc important de vérifier ces données dans des modèles de mammifères ayant des caractéristiques physiologiques proches de l'espèce humaine. La définition des fenêtres d'exposition au cours desquelles les effets sont les plus sévères doit tenir compte des spécificités d'espèce. Des études longitudinales (suivi à plusieurs stades de la vie) devront être conduites pour évaluer les mécanismes d'adaptation.

Par ailleurs, les travaux réalisés sur plusieurs lignées cellulaires proposent des mécanismes d'actions très divers du BPA qui ne se cantonnent pas aux effets de type œstrogénique. L'importance de tels mécanismes dans les effets du BPA reste à démontrer dans des modèles *in vivo*. Des analyses moléculaires fines issues de l'étude du transcriptome, du protéome, du métabolome des tissus et cellules exposés au BPA à faibles doses contribueront à mieux comprendre les mécanismes d'action. Ces approches intégratives globales seront nécessaires pour appréhender l'ensemble des effets du BPA sur un tissu donné.

Quelques études ont également montré une altération des marques épigénétiques au niveau des gamètes suite à des expositions au BPA. Elles posent le problème de la transmission des effets délétères aux générations suivantes. C'est pourquoi les études longitudinales doivent être poursuivies sur plusieurs générations.

Enfin, les études *in vivo* réalisées dans plusieurs lignées d'une même espèce, montrent des variabilités intra espèce (et inter individu) de réponse au BPA. Ces variabilités sont le reflet des variations des patrimoines génétiques (polymorphisme au niveau des génomes) et également des expositions antérieures subies (génération(s) précédente(s), vie intra-utérine, environnement et alimentation au cours des différentes phases de vie, exposition à d'autres composés). L'observation de résultats opposés ou la mise en évidence de sensibilité différente de certaines lignées ne sont donc pas des arguments en faveur de l'absence d'effets mais doivent être utilisés pour comprendre en quoi ces différences (génétiques, environnementales) modulent la réponse au BPA. Il

s'agit là de pistes pour identifier des populations ou des conditions ou pratiques de vie à risque.

Bibliographie

BETANCOURT AM, MOBLEY JA, RUSSO J, LAMARTINIERE CA. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. *J Proteomics* 2010, **73** : 1241-1253

BOUSKINE A, NEBOUT M, BRUCKER-DAVIS F, BENAHMED M, FENICHEL P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1053-1058

BREDHULT C, BACKLIN BM, OLOVSSON M. Effects of Some Endocrine Disruptors on the Proliferation and Viability of Human Endometrial Endothelial Cells in Vitro. *Reprod Toxicol* 2007, **23** : 550-559

BREDHULT C, SAHLIN L, OLOVSSON A. Gene Expression Analysis of Human Endometrial Endothelial Cells Exposed to Bisphenol *Reprod Toxicol* 2009, **28** : 18-25

BUTEAU-LOZANO H, VELASCO G, CRISTOFARI M, BALAGUER P, PERROT-APPLANAT M. Xenœstrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *J Endocrinol* 2008, **196** : 399-412

DURANDO M, KASS L, PIVA J, SONNENSCHEIN C, SOTO AM, et coll. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect*2007, **115** : 80-86

FIORINI C, TILLOY-ELLUL A, CHEVALIER S, CHARUEL C, POINTIS G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 413-421

GRASSELLI F, BARATTA L, BAIONI L, BUSSOLATI S, RAMONI R, et coll. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol* 2010 [Epub ahead of print]

HESS-WILSON JK, WEBB SL, DALY HK, LEUNGYK, BOLDISON J, et coll. Unique bisphenol A transcriptome in prostate cancer : novel effects on ERbeta expression that correspond to androgen receptor mutation status. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1646-1653

HO SM, TANG WY, BELMONTE DE FJ, PRINS GS. Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Res* 2006, **66** : 5624-5632

JENKINS S, RAGHURAMAN N, ELTOUM I, CARPENTER M, RUSSO J, et coll. Oral exposure to bisphenol a increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ Health Perspect* 2009, **17** : 910-915

KWINTKIEWICZ J, NISHI Y, YANASE T, GIUDICE LC. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Mediates the Endocrine Disrupter Bisphenol A Inhibition of FSH-stimulated IGF-I, Aromatase and Estradiol in Human Granulosa Cells. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 400-406

LAPENSEE EW, TUTTLE TR, FOX SR, BEN-JONATHAN N. Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 175-180

LA SALA G, FARINI D, DE FELICI M. Estrogenic in vitro assay on mouse embryonic Leydig cells. *Int J Dev Biol* 2010, **54** : 717-722

LI MW, MRUK DD, LEE WM, CHENG CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro : is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41** : 2302-2314

LI MW, MRUK DD, LEE WM, CHENG CY. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proc Natl Acad Sci* USA 2010, **107** : 17998-18003

MARKEY CM, LUQUE EH, MUNOZ DE TM, SONNENSCHEIN C, SOTO AM. In Utero Exposure to Bisphenol A Alters the Development and Tissue Organization of the Mouse Mammary Gland. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1215-1223

MILMAN HA, BOSLAND MC, WALDEN PD, HEINZE JE. Evaluation of the Adequacy of Published Studies of Low-Dose Effects of Bisphenol A on the Rodent Prostate for Use in Human Risk Assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002, **35** : 338-346

MORAL R, WANG R, RUSSO IH, LAMARTINIERE CA, PEREIRA J, et coll. Effect of Prenatal Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A on Mammary Gland Morphology and Gene Expression Signature. *J Endocrinol* 2008, **196** : 101-112

MUNOZ-DE-TORO M, MARKEY CM, WADIA PR, LUQUE EH, RUBIN BS, et coll. Perinatal Exposure to Bisphenol-A Alters Peripubertal Mammary Gland Development in Mice. *Endocrinology* 2005, **146** : 4138-4147

MURRAYTJ, MAFFINI MV, UCCI AA, SONNENSCHEIN C, SOTO AM. Induction of Mammary Gland Ductal Hyperplasias and Carcinoma in Situ Following Fetal Bisphenol A Exposure. *Reprod Toxicol* 2007, **23** : 383-390

NACIFF JM, KHAMBATTA ZS, REICHLING TD, CARR GJ, TIESMAN JP, et coll. The genomic response of Ishikawa cells to bisphenol A exposure is dose- and time-dependent. *Toxicology* 2010, **270** : 137-149

NAGEL SC, VOM SAAL FS, THAYER KA, DHAR MG, BOECHLER M, WELSHONS WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenœstrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 1997, **105** : 70-76

OOE H, TAIRA T, IGUCHI-ARIGA SM, ARIGA H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 2005, **88** : 114-126

OGURA Y, ISHII K, KANDA H, KANAI M, ARIMA K, et coll. Bisphenol A Induces Permanent Squamous Change in Mouse Prostatic Epithelium. *Differentiation* 2007, **75** : 745-756

RICHTER CA, TAYLOR JA, RUHLEN RL, WELSHONS WV, VOM SAAL FS. Estradiol and Bisphenol A Stimulate Androgen Receptor and Estrogen Receptor Gene Expression in Fetal Mouse Prostate Mesenchyme Cells. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 902-908

SIGNORILE PG, SPUGNINI EP, MITA L, MELLONE P, D'AVINO A, et coll. Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen Comp Endocrinol* 2010, Mar 27.[Epub ahead of print]

SONG KH, LEE K, CHOI HS. Endocrine disrupter bisphenol a induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology* 2002, **143** : 2208-2215

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

TYL RW, MYERS CB, MARR MC, SLOAN CS, CASTILLO NP, et coll. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 2008, **104** : 362-384

VANDENBERG LN, MAFFINI MV, SCHAEBERLE CM, UCCI AA, SONNENSCHEIN C, et coll. Perinatal Exposure to the Xenœstrogen Bisphenol-A Induces Mammary Intraductal Hyperplasias in Adult CD-1 Mice. *Reprod Toxicol* 2008, **26** : 210-219

WADIA PR, VANDENBERG LN, SCHAEBERLE CM, RUBIN BS, SONNENSCHEIN C, et coll. Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Estrogen Sensitivity of the Mammary Gland in Diverse Mouse Strains. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 592-598

XU J, OSUGA Y, YANO T, MORITA Y, TANG X, et coll. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **292** : 456-462

ZHOU W, LIU J, LIAO L, HAN S, LIU J. Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008, **283** : 12-18

28
Effets chromosomique, génétique et épigénétique

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

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

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

Effets méiotiques

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

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

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

Configuration chromosomique

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

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

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

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

Aneuploïdie

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

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

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

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

Effets épigénétiques

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

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

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

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

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

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

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

Effets multigénérationnels et transgénérationnels d'exposition précoce au BPA

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

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

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

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

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

Bibliographie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

29
Mécanismes d'action

Le bisphénol A (BPA) est un agoniste faible des œstrogènes pouvant se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β (ERα et β) et activer une réponse qui a été largement considérée comme la source de ses « effets » indésirables dans (certaines) études animales. Cependant, le BPA présente plusieurs milliers de fois moins d'affinité pour ERα et β que l'œstradiol. Certaines études *in vitro* ont montré également que le BPA a des effets anti-androgéniques et peut se lier au récepteur des androgènes (AR) (Sun et coll., 2006), mais les preuves d'effets antiandrogéniques *in vivo* chez l'animal sont rares ou absentes (Kobayashi et coll., 2002 ; Tyl et coll., 2002 ; Howdeshell et coll., 2008). Plus récemment, des liaisons du BPA à d'autres récepteurs nucléaires ou membranaires ont été démontrées.

Récepteurs nucléaires des œstrogènes alpha et bêta

Le BPA avec ses deux noyaux phénoliques a un mode de liaison à ERα et β similaire à celui de l'œstradiol (E2) (figure 29.1). Cependant son affinité est 10 000 fois plus faible que celle de l'œstradiol et est similaire pour les deux récepteurs (Kuiper et coll., 1998).

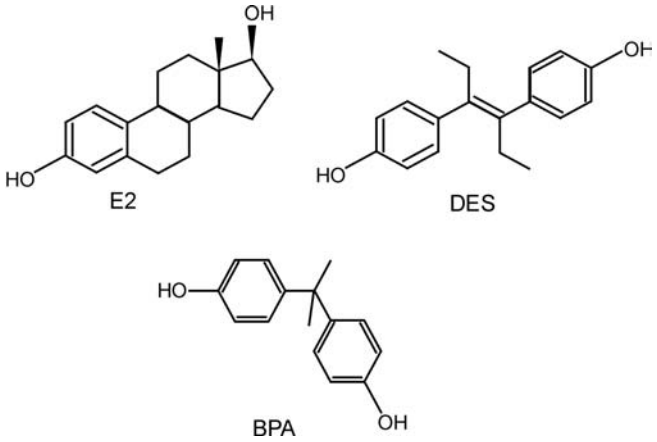


Figure 29.1 : Structures chimiques de l'œstradiol (E2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A (BPA)

Le BPA est considéré comme un *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM). Les SERM sont souvent des molécules à activité agoniste partielle. Cette activité varie selon le promoteur du gène étudié, selon le contexte cellulaire (*in vitro*) ou l'organe considéré (*in vivo*). Cet agonisme partiel a été étudié par Gould (Gould et coll., 1998) qui a par exemple montré qu'*in vitro* le BPA est moins actif que E2 sur ERα délété de son domaine d'activation constitutive AF-1. Les travaux de Sumpter (Routledge et coll., 2000) ont montré que le recrutement de co-facteurs transcriptionnels différait entre E2 et BPA. Enfin, en lien avec cette activité d'agoniste partiel, certaines réponses *in vivo* de l'œstradiol dans l'utérus de souris ne sont pas observées avec le BPA comme l'augmentation du poids de l'utérus alors que d'autres sont maintenues comme une activité peroxydase ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur de la progestérone (Gould et coll., 1998). Ces résultats ont été confortés par les travaux de Nagel qui ont montré qu'un traitement au BPA augmentait peu la croissance utérine et en revanche activait l'expression d'un gène rapporteur (Nagel et coll., 2001). Au contraire, d'autres SERM comme l'hydroxy-tamoxifène utilisé pour le traitement du cancer du sein est actif sur la croissance utérine et sans effet sur l'activation du gène rapporteur. Le fait que le BPA soit un SERM peut expliquer pourquoi certaines études n'ont pas pu montrer d'effets *in vivo* de ce composé. Ainsi, le BPA présente à peu près les mêmes effets que E2 au niveau de la prostate de fœtus murins (Timms et coll., 2005). En revanche, ces effets diffèrent beaucoup de ceux de E2 dans l'utérus (Markey et coll., 2001).

Enfin, la faible affinité du BPA pour ERα et β ne permet pas d'expliquer les effets observés à faible dose à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, certaines études ont montré des réponses au BPA qui suivent des courbes non monotones et qui ne peuvent pas être expliquées par une action sur un seul type de récepteur. C'est pour ces raisons que plusieurs groupes de scientifiques ont cherché à identifier d'autres médiateurs des effets du BPA. La liaison du BPA avec des affinités variées à plusieurs récepteurs ayant des actions différentes pourrait expliquer d'une part des effets à faible dose (plus faible que celle permettant la liaison à ERα et β) et d'autre part des effets particuliers suivant la dose. Les différents récepteurs pouvant médier les effets du BPA sont décrits ci-dessous.

Récepteurs des œstrogènes membranaires

Des études récentes ont montré que le BPA pouvait d'une part avoir des effets à des concentrations plus faibles que celles auxquelles il se lie à ERα et β et d'autre part agir très rapidement (quelques minutes) ce qui exclut une action médiée par des récepteurs nucléaires. Des effets dits « non génomiques » pourraient faire intervenir des récepteurs localisés dans le cytoplasme, dans la mitochondrie ou dans la membrane cytoplasmique. Deux types de récepteurs ont été décrits.

Les premiers pourraient être des formes membranaires de ERα et β (mERα et β). La localisation à la membrane de ces récepteurs n'est pas clairement expliquée mais elle pourrait être due à des modifications post-traductionnelles comme la palmitoylation (Hammes et Levin, 2007). Le groupe de Watson a proposé que le BPA pourrait médier une partie des effets par ce type de récepteurs (Watson et coll., 2007a et b, 2010). Les auteurs ont montré que le BPA à des doses très faibles (1 picomolaire) induisait rapidement (en moins d'une minute) l'augmentation de calcium intracellulaire puis la sécrétion de prolactine dans la lignée pituitaire GH3/B6. Ces réponses ne peuvent pas être représentées par une courbe monotone. Egalement observés avec E2, ces effets sont inhibés par un co-traitement avec du fulvestrant (un anti-œstrogène). L'augmentation de calcium intracellulaire à des doses faibles de BPA (0,1-1 nM) a également été observée dans des cellules pancréatiques (Quesada et coll., 2002) ainsi que dans la lignée de cancer du sein MCF-7 (Walsh et coll., 2005). La liaison à des récepteurs des œstrogènes membranaires permet d'expliquer certains des effets rapides (ou non génomiques) du BPA. En revanche, elle ne permet pas d'expliquer les effets à faible concentration. En effet, il est supposé que ces formes membranaires ont la même affinité pour le BPA que les formes nucléaires.

Un deuxième médiateur des effets non génomiques du BPA pourrait être le récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, GPR30. Ce récepteur différent des récepteurs nucléaires des œstrogènes est localisé dans le réticulum endoplasmique et il pourrait lier le BPA à faible concentration. Les travaux du groupe de Fénichel (Bouskine et coll., 2008 et 2009) ont montré que le BPA stimulait la prolifération des cellules testiculaires JKT-1. Cet effet est observable aux faibles doses (1 picomolaire) et s'atténue aux fortes doses (courbe en U inversé). Une augmentation de la prolifération des cellules testiculaires JKT-1 est également observée avec de l'œstradiol couplé à de la BSA (dans ce cas, l'œstradiol ne peut pas pénétrer dans la cellule) alors qu'une inhibition est observée avec l'œstradiol non couplé à la BSA. Les cellules testiculaires JKT-1 expriment GPR30 et le récepteur nucléaire des œstrogènes ERβ. ERβ contrairement au récepteur nucléaire ERα inhibe généralement la prolifération cellulaire (Hartmann et coll., 2006 ; Williams et coll., 2008). Dans cette étude, les auteurs proposent que le BPA à faibles concentrations (inférieures au nM) active la prolifération à travers GPR30. En revanche, à fortes concentrations (>1 nM), le BPA se lie également à ERβ qui ayant une action antiproliférative bloquerait les effets activateurs de GPR30 sur la croissance cellulaire. Ainsi, E2 qui se lie avec une bonne affinité aux deux récepteurs (ERβ et GPR30) est plutôt antiproliératif. Au contraire, l'œstradiol modifié ne pouvant pas pénétrer dans la cellule (couplé à la BSA) se lie uniquement à GPR30 et présente un effet proliératif. Cette étude illustre bien comment le BPA peut exercer des effets différents en fonction de sa concentration. Il agirait sur au moins deux récepteurs (ici GPR30 et ERβ) en se liant avec des affinités différentes (fortes pour GPR30, faible pour ERβ) qui ont des actions opposées sur une même réponse cellulaire (ici la prolifération).

Le rôle de GPR30 dans la prolifération cellulaire a été confirmé par d'autres études comme celles du groupe de Maggiolini (Albanito et coll., 2007 ; Sirianni et coll., 2008). Ces travaux ont montré dans la lignée spermatogonique GC-1 que E2 ou un ligand sélectif de GPR30 (ligand G1) activait la prolifération cellulaire par un mécanisme non génomique (Sirianni et coll., 2008). Cette équipe a également montré que GPR30 pouvait médier certains des effets de E2 dans des lignées de cancer de l'ovaire ou du sein ER alpha positives ou négatives (Albanito et coll., 2007).

Le rôle de GPR30 dans l'effet de E2 ou du BPA n'est cependant pas admis par l'ensemble de la communauté scientifique. Les travaux d'Otto notamment s'opposent vivement à l'hypothèse que GPR30 puisse médier des effets œstrogéniques (Otto et coll., 2008 et 2009 ; Langer et coll., 2010). Cette équipe a montré *in vitro* que GPR30 ne liait pas E2, que le ligand spécifique de GPR30, G-1 n'induisait pas de réponses œstrogéniques. De plus, leurs études *in vivo* ont montré que les souris déficientes en GPR30 (GPR30-/-) ne présentaient pas d'anomalies au niveau du développement des organes cibles de la reproduction (ovaires, utérus, glandes mammaires), de problèmes de fertilité ni de perturbation des réponses œstrogéniques dans l'utérus ou dans la glande mammaire.

Malgré cette controverse, ces résultats indiquent que des effets rapides ou non génomiques du BPA pourraient être médiés par des formes membranaires de récepteurs aux œstrogènes. Le médiateur de ces effets pour les faibles concentrations n'est pas identifié de façon certaine. Les récepteurs membranaires ERα et β sont supposés avoir la même affinité que leurs équivalents nucléaires et l'interaction entre GPR30 et bisphénol A (ainsi qu'avec E2) n'a pas pu être démontré par des techniques biochimiques classiques. L'identification récente de ligands agonistes (Revankar et coll., 2005) et antagonistes (Dennis et coll., 2009) de GPR30 ne se liant pas aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β et l'étude des effets de ces molécules dans davantage de modèles cellulaires (exprimant ou pas ERα, ERβ nucléaire et membranaire et GPR30) permettra certainement de répondre à ces questions.

Récepteur des androgènes (AR)

Les autres hypothèses pouvant expliquer les effets faibles doses ainsi que les effets non monotones du BPA sont sa liaison à d'autres types de récepteurs nucléaires. Plusieurs études ont montré que le BPA se liait au récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Sohoni et Sumpter, 1998 ; Paris et coll., 2002 ; Lee et coll., 2003 ; Xu, 2005 ; Li, 2010). Contrairement aux ERs, le BPA est un antagoniste pour AR et son affinité est de l'ordre du micromolaire. Les effets observés à faible dose pourraient en partie s'expliquer par des action synergiques à travers les récepteurs ER (action agoniste et féminisante) et le récepteur AR (action antagoniste donc antagoniste de l'effet masculinisant).

D'autre part, il est à noter que le BPA a une activité agoniste à faibles concentrations (1 à 10 nanomolaire) sur une forme mutée de AR (AR-T877A) associée à des cancers de la prostate résistants aux anti-androgènes (Wetherill et coll., 2002, 2005).

Récepteur relié aux œstrogènes gamma (ERRγ)

Très récemment, le BPA a également été identifié comme un ligand du récepteur ERRγ (Abad et coll., 2008 ; Okada et coll., 2008 ; Li et coll., 2010). Son affinité est de l'ordre de 5 nanomolaire. ERRγ est un récepteur constitutivement activé qui est légèrement activé par le BPA. Bien que les fonctions physiologiques de ERRγ ne soient pas bien connues, le fait que ERRγ puisse se lier sur les mêmes promoteurs de gènes que les récepteurs des œstrogènes (Vanacker et coll., 1999) pourrait expliquer en partie les effets de perturbation endocrine du BPA.

Liaison à d'autres récepteurs nucléaires potentiellement non impliqués dans les effets reprotoxiques du BPA

Des études ont montré que des dérivés halogénés du BPA, le tétra bromo-BPA (TBBPA) et le tétra chloro-BPA (TCBPA) (mais pas le BPA) se liaient aux récepteurs des hormones thyroïdiennes (Kitamura et coll., 2002). Cette étude a également montré que comme l'hormone thyroïdienne T3, le TBBPA et le TCBPA avaient un effet activateur sur la prolifération des cellules pituitaires GH3. Curieusement, l'étude de Sun a plutôt classé ces dérivés comme ayant un effet antagoniste (Sun et coll., 2009) dans un test de gènes rapporteurs. Ces molécules qui semblent se lier aux TR mais avec des niveaux d'activation différents selon les types cellulaires ou les réponses étudiées pourraient être des molécules à activité agoniste partielle ou SnuRM (modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires). Il faut souligner que ces effets (anti)thyroïdiens ne sont observés qu'à fortes concentrations (de 1 à 10 mM).

Les mêmes dérivés halogénés du BPA (Balaguer communication personnelle) ainsi que le BADGE (Wright et coll., 2000 ; Seimandi et coll., 2005) sont des ligands du récepteur PPARγ (Balaguer, communication personnelle) avec une affinité de l'ordre du mM. De nombreuses études ont établi un lien entre exposition au BPA et obésité (Rubin et coll., 2001 ; Masuno et coll., 2005 ; Miyawaki et coll., 2007 ; Somm et coll., 2009). Ces effets pourraient être médiés par PPARγ et être dus au BPA ou à un de ses métabolites. Dans l'étude de Kwintkiewicz et coll. (2010), il est à noter que le BPA induit l'expression de PPARγ. PPARγ comme d'autres gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire sont sous le contrôle de ce récepteur. Cependant, cet effet est observable uniquement à forte concentration (1 à 100 mM).

Enfin, le BPA a été identifié comme étant capable d'activer les récepteurs RXR dans un test de gène rapporteur incluant du métabolisme (Li et coll., 2008) et d'augmenter l'expression du récepteur nucléaire Nur77 (Song et coll., 2002 ; Ahn et coll., 2008) qui est impliqué dans la stéroïdogénèse.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats indiquent que le bisphénol A et/ou des molécules dérivées sont capables de se lier à différents récepteurs nucléaires ou membranaires. Les affinités de liaison ne sont pas très fortes (excepté pour GPR30 si l'interaction est confirmée) mais des synergies d'action entre récepteurs nucléaires (récepteurs ERα, ERβ et AR) peuvent expliquer des effets à faible dose. D'autre part, le fait que le BPA se lie à des formes membranaires des récepteurs des œstrogènes indique qu'il pourrait également se lier à des formes membranaires d'autres récepteurs nucléaires comme AR (Bonaccorsi et coll., 2008) ou TRα ou β (Iordanidou et coll., 2010).

Bibliographie

ABAD MC, ASARI H, O'NEILL J, KLINGER AL, MILLIGAN C, et coll. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, **108** : 44-54

AHN SW, NEDUMARAN B, XIE Y, KIM DK, KIM YD, CHOI HS. Bisphenol A bis(2,3-dihydroxypropyl) ether (BADGE.2H2O) induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and increases steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Mol Cells* 2008, **26** : 74-80

ALBANITO L, MADEO A, LAPPANO R, VIVACQUA A, RAGO V, et coll. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007, **67** : 1859-1866

BONACCORSI L, NOSI D, QUERCIOLI F, FORMIGLI L, ZECCHI S, et coll. Prostate cancer : a model of integration of genomic and non-genomic effects of the androgen receptor in cell lines model. *Steroids* 2008, **73** : 1030-1037

BOUSKINE A, NEBOUT M, MOGRABI B, BRÜCKER-DAVIS F, ROGER C, FENICHEL P. Estrogens promote human testicular germ cell cancer through a membrane-mediated activation of extracellular regulated kinase and protein kinase A. *Endocrinology* 2008, **149** : 565-573

BOUSKINE A, NEBOUT M, BRÜCKER-DAVIS F, BENAHMED M, FENICHEL P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1053-1058

DENNIS MK, BURAI R, RAMESH C, PETRIE WK, ALCON SN, et coll. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* 2009, **5** : 421-427

GOULD JC, LEONARD LS, MANESS SC, WAGNER BL, CONNER K, et coll. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1998, **142** : 203-14

HAMMES S, LEVIN E. Extranuclear steroid receptors : nature and actions. *Endocr Rev* 2007,**28** : 726-41

HARTMAN J, LINDBERG K, MORANI A, INZUNZA J, STRÖM A, GUSTAFSSON J. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006, **66** : 11207-11213

HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, WILSON VS, RYAN BC, et coll. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci* 2008, **102** : 371-382

IORDANIDOU A, HADZOPOULOU-CLADARAS M, LAZOU A. Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes : relevance to gene expression and cell growth. *Mol Cell Biochem* 2010, **340** : 291-300

KITAMURA S, JINNO N, OHTA S, KUROKI H, FUJIMOTO N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293** : 554-559

KOBAYASHI K, MIYAGAWA M, WANG RS, SEKIGUCHI S, SUDA M, et coll. Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring. *Ind Health* 2002, **40** : 375-381

KUIPER G, LEMMEN J, CARLSSON B, CORTON J, SAFE S, et coll. Interaction of estrogenic chemicals and phytœstrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998, **139** : 4252-4263

KWINTKIEWICZ J, NISHI Y, YANASE T, GIUDICE LC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma mediates the endocrine disrupter bisphenol a inhibition of fsh-stimulated igf-i, aromatase and estradiol in human granulosa cells. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 400-406

LANGER G, BADER B, MEOLI L, ISENSEE J, DELBECK M, et coll. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids* 2010, **75 (8-9)** : 603-610

LEE HJ, CHATTOPADHYAY S, GONG EY, AHN RS, LEE K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 2003, **75** : 40-46

LI J, MA M, WANG Z. A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on retinoid X receptor-mediated gene expression. *Toxicol Lett* 2008, **176** : 198-206

LI J, MA M, WANG Z. In vitro profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicol In Vitro* 2010, **24** : 201-207

MARKEY CM, MICHAELSON CL, VESON EC, SONNENSCHEIN C, SOTO AM. The mouse uterotrophic assay : a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 55-60

MASUNO H, IWANAMI J, KIDANI T, SAKAYAMA K, HONDA K. Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci* 2005, **84** : 319-327

MIYAWAKI J, SAKAYAMA K, KATOH, YAMAMOTO H, MASUNO H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice J *Atheroscler Thromb* 2007, **14** : 245-252

NAGEL SC, HAGELBARGER JL, MCDONNELL DP. Development of an ER action indicator mouse for the study of estrogens, selective ER modulators (SERMs), and Xenobiotics. *Endocrinology* 2001, **142** : 4721-4728

OKADA H, TOKUNAGA T, LIU X, TAKAYANAGI S, MATSUSHIMA A, SHIMOHIGASHI Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect*2008, **116** : 32-38

OTTO C, ROHDE-SCHULZ B, SCHWARZ G, FUCHS I, KLEWER M, et coll. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 2008, **149** : 4846-4856

OTTO C, FUCHS I, KAUSELMANN G, KERN H, ZEVNIK B, et coll. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 2009, **80** : 34-41

PARIS F, BALAGUER P, TÉROUANNE B, SERVANT N, LACOSTE et coll. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002, **193** : 43-49

QUESADA I, FUENTES E, VISO-LEON MC, SORIA B, RIPOLL C, et coll. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* 2002, **16** : 1671-1673

REVANKAR CM, CIMINO DF, SKLAR LA, ARTERBURN JB, PROSSNITZ ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005, **307** : 1625-1630

ROUTLEDGE EJ, WHITE R, PARKER MG, SUMPTER JP. Differential effects of xenœstrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *J Biol Chem* 2000, **275** : 35986-35993

RUBIN BS, MURRAY MK, DAMASSA DA, KING JC, SOTO AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 675-680

SEIMANDI M, LEMAIRE G, PILLON A, PERRIN A, CARLAVAN I, et coll. Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands *Anal Biochem* 2005, **344** : 8-15

SIRIANNI R, CHIMENTO A, RUGGIERO C, DE LUCA A, LAPPANO R, et coll. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* 2008, **149** : 5043-5051

SOHONI P, SUMPTER JP. Several environmental estrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 1998, **158** : 327-339

SOMME E, SCHWITZGEBEL VM, TOULOTTE A, CEDERROTH CR, COMBESCURE C, et coll. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1549-1555

SONG KH, LEE K, CHOI HS. Endocrine disrupter bisphenol a induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology* 2002, **143** : 2208-2215

SUN H, XU LC, CHEN JF, SONG L, WANG XR. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food Chem Toxicol* 2006, **44** : 1916-1921

SUN H, SHEN OX, WANG XR, ZHOU L, ZHEN SQ, CHEN XD. Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicol In Vitro* 2009, **23** : 950-954

TIMMS BG, HOWDESHELL KL, BARTON L, BRADLEY S, RICHTER CA, VOM SAAL FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, **102** : 7014-7019

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

VANACKER JM, PETTERSSON K, GUSTAFSSON JA, LAUDET V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor- related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ER beta. *EMBO J* 1999, **18** : 4270-4279

VANDENBERG LN, WADIA PR, SCHAEBERLE CM, RUBIN BS, SONNENSCHEIN C, SOTO AM. The mammary gland response to estradiol : monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006 **101** : 263-274

WALSH DE, DOCKERY P, DOOLAN CM. Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on [Ca2+]i in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005, **230** : 23-30

WATSON CS, ALYEA RA, JENG YJ, KOCHUKOV MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2007a, **274** : 1-7

WATSON CS, BULAYEVA NN, WOZNIAK AL, ALYEA RA. Xenestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* 2007b, **72** : 124-134

WATSON CS, JENG YJ, KOCHUKOV MY. Nongenomic signaling pathways of estrogen toxicity. *Toxicol Sci* 2010, **115(1)** : 1-11

WETHERILL YB, PETRE CE, MONK KR, PUGA A, KNUDSEN KE. The xenœstrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2002, **1** : 515-524

WETHERILL YB, FISHER NL, STAUBACH A, DANIELSEN M, DE VERE WHITE RW, KNUDSEN KE. Xenœstrogen action in prostate cancer : pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res* 2005, **65** : 54-65

WILLIAMS C, EDVARDSSON K, LEWANDOWSKI SA, STRÖM A, GUSTAFSSON JA. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 2008, **27** : 1019-1032

WRIGHT HM, CLISH CB, MIKAMI T, HAUSER S, YANAGI K, et coll. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2000, **275** : 1873-1877

XU LC, SUN H, CHEN JF, BIAN Q, QIAN J, et coll. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 2005, **216** : 197-203

30
Relation structure–fonction

La structure chimique d'une classe de perturbateurs endocriniens, les diphénylalcanes hydroxylés ou bisphénols (BP), ayant une activité œstrogénique (œstrogéno-mimétique) significative, est composée par deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone. La structure du bisphénol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane en nomenclature IUPAC), composé le plus connu de cette famille, est représentée en figure 30.1.

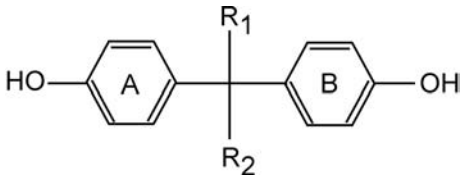


Figure 30.1 : Formule semi-développée des bisphénols

Ces molécules interagissent avec les mêmes récepteurs (ERα, ERβ ou ERRγ) que les œstrogènes naturels comme l'œstradiol (E2) (Agatonovic-Kustrin et Turner, 2008). Par différence avec l'œstradiol, la structure d'un récepteur cristallisé avec le BP n'a pas été résolue par analyse aux rayons X. Cependant, des études expérimentales et/ou théoriques ont mis en évidence différents types d'interactions substrat (BP)/récepteur, mettant en œuvre soit des analogies avec E2 (groupements hydrophobes, hydrophiles, accepteurs/donneurs de liaison H), soit des simulations atomistiques. Ces études ont conduit à des relations bien définies entre les caractéristiques structurales et l'activité biologique (souvent *in vitro*) de cette classe de BP.

En effet, la partie 66-Kd du récepteur ER se compose de trois domaines structuralement distincts : un domaine N-terminal de liaison à l'ADN, un domaine N-terminal et un domaine C-terminal formant une poche hydrophobe (Brzozowski et coll., 1997 ; Tanenbaum et coll., 1998). Cette cage tridimensionnelle est composée de plusieurs sites de liaison non spécifiques sur lesquels peuvent se loger l'œstrogène ainsi que d'autres ligands (figure 30.2). Avec un volume de 440 $Å^3$, la poche de liaison est beaucoup plus grande qu'une molécule d'œstrogène, occupant à elle seule un volume de 245 $Å^3$ (pour E2). Ce volume vide est construit à l'aide de résidus non polaires lui conférant la capacité à se lier avec une grande variété de ligands dont la

structure prend en compte un groupement phénol, discriminant retrouvé sur la molécule d'œstrogène.

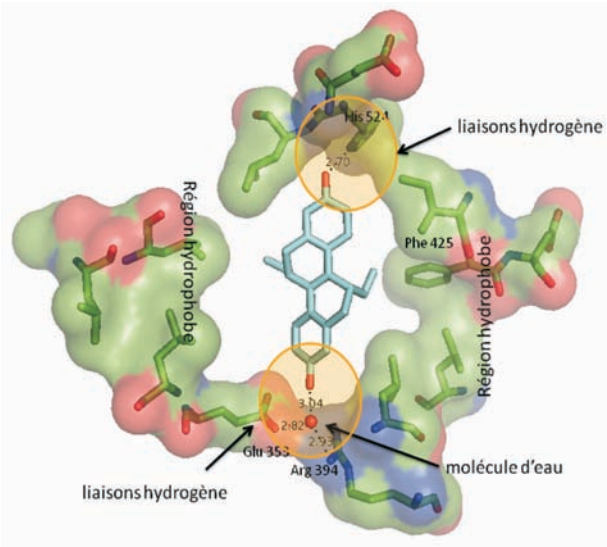


Figure 30.2 : Structure à rayons X de la poche hydrophobe du ERα avec le substrat naturel 17β œstradiol (E2) (Brzozowski et coll., 1997 ; Tanenbaum et coll., 1998)

Études *in-silico*

Au cours de ces dernières années, un grand nombre de travaux portant sur des méthodes QSAR ont été dédiés à l'étude des interactions de ligands non stéroïdiens avec le récepteur ER. Le BPA et ses dérivées ont fait l'objet de quelques travaux spécifiques (Coleman et coll., 2003) mais sont le plus souvent inclus dans le jeu d'entraînement ou de validation des modèles QSAR (Gao et coll., 1999 ; Shi et coll., 2001 ; Waller, 2004 ; Devillers et coll., 2006 ; Kadowaki et coll., 2007 ; Liu et coll., 2007 ; Roncaglioni et coll., 2008a et b). Il faut toutefois souligner que dans la plupart de ces travaux, le critère d'évaluation est l'affinité de liaison au récepteur, absolue (*binding affinity*, BA) ou relative au ligand naturel E2 (*relative binding affinity*, RBA). Des critères d'évaluation plus complexes sont rarement considérés (Coleman et coll., 2003 ; Roncaglioni et coll., 2008a).

Les jeux d'entraînements sont généralement composés de plusieurs centaines de molécules, mais les jeux de validation sont souvent plus petits (une centaine de molécules), sauf dans quelques cas particuliers (Liu et coll., 2007). Ces modèles permettent la détermination qualitative et/ou quantitative de l'activité œstrogénique en termes d'affinité. Des accords allant jusqu'à

90 % ont été obtenus sur des modèles qualitatifs fournissant une réponse binaire, de type active ou non active (Liu et coll., 2007). Les modèles quantitatifs, plus complexes, présentent également de très bonnes corrélations (R2>0,90) en ce qui concerne l'affinité avec les ER, et des pouvoirs prédictifs (q2>0,6) pour de très grands ensembles de ligands de structures extrêmement variées (Shi et coll., 2001) (figure 30.3).

Une amélioration significative a été apportée en couplant les modèles QSPR traditionnels avec des approches de type « docking » et *ab-initio*.

Dans ce cas, le modèle se caractérise par une excellente corrélation (R2=0,991) et une très bonne prédictivité (q2=0,92) (Sippl et coll., 2000).

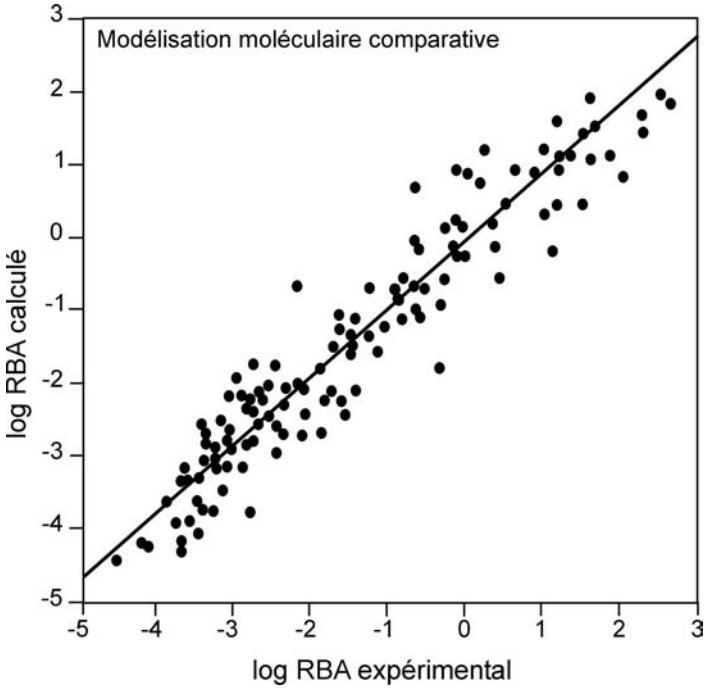


Figure 30.3 : Exemple d'une corrélation linéaire (R2=0,91) entre l'affinité de liaison relative à E2 (*relative binding affinity*) calculée et expérimentale (Shi et coll., 2001)

Malheureusement, seul un ensemble restreint de molécules (30) a été considéré, et ceci principalement à cause des limitations informatiques. Par ailleurs, des travaux de type QSAR traditionnel ont été effectués dans le cadre des normes réglementaires OCDE (Tong et coll., 2003 ; Liu et coll., 2006 ; Jensen et coll., 2008). Ces modèles ont également permis d'identifier les principales caractéristiques structurales nécessaires lors de l'interaction ligand récepteur. Néanmoins, des informations plus détaillées sur les interactions microscopiques

entre le ligand et l'ER peuvent être déterminées en combinant des approches expérimentales dans lesquelles plusieurs ligands sélectivement modifiés sont testés à l'aide de modèles QSAR, de docking ou d'atomistique. En particulier, l'étude des interactions ligand-ER portant sur des modèles de chimie quantique a montré que l'énergie d'interaction théorique et l'affinité déterminée de façon expérimentale sont bien corrélées (Fukuzawa et coll., 2005). Ces modèles donnent non seulement des informations sur les mécanismes sous-jacents, mais également une relation linéaire (R>0,8) entre l'énergie d'interaction calculée et l'activité expérimentale. Le croisement des données théoriques avec les informations expérimentales a permis l'individualisation des caractéristiques structurales du ligand (Kadowaki et coll., 2007).

Relation structure-fonction

Les ERs peuvent lier un nombre important de molécules structuralement différentes. Les caractéristiques principales de leurs ligands naturels (stéroïdes) relèvent de la présence d'un groupement aromatique hydroxylé (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe (Anstead et coll., 1997 ; Fang et coll., 2001). Ces caractéristiques essentielles pour l'activité œstrogénique se retrouvent également dans les BP, molécules caractérisées par un cycle aromatique porteur d'un groupement hydroxyle (cycle A, figure 30.1) et éventuellement substituée en position para. La structure à cycles condensés, retrouvée dans le cas de E2 n'est par conséquent pas nécessaire pour obtenir une activité œstrogénique en terme de prolifération des cellules de cancer du sein humaines MCF-7 (Dodds et Lawson, 1936 ; Perez et coll., 1998), et peut même donner lieu à des composés non actifs comme les dérivés naphtols (Soto et coll., 1995). La présence du groupement hydroxyle est fondamentale dans l'activité œstrogénique. En effet, l'élimination d'un groupement OH conduit au 4-a-cumylphénol (HOC_6H_4-$C(CH_3)_2$-C_6H_5), composé ayant une affinité de liaison (*binding affinity*) avec le récepteur égale à celle du BPA, alors que l'élimination du second OH, donne lieu au composé 2,2-diphénylpropane (C_6H_5-$C(CH_3)_2$-C_6H_5), molécule complètement inactive (vis-à-vis du récepteur ERRγ) (Okada et coll., 2008).

La présence d'un second groupement fonctionnel à base d'oxygène (hydroxyle, cétone, ou carbonyle), positionné sur la partie terminale de la molécule, en opposition au cycle phénolique, confère ou du moins augmente l'activité œstrogénique (cellules MCF-7) (Perez et coll., 1998). Le BPA et le bisphénol F (BPF, 4,4'-Methylenbisphénol), tous deux porteurs de deux groupements OH, ou le bisphénol A dimethacrylate (BIS-DMA) et le bisphénol-A-bis chloroformate (BPACF) ont montré une activité œstrogénique lors des tests de prolifération et d'induction protéique (Perez et coll., 1998).

Par analogie avec E2, ces deux groupements sont nécessaires pour établir deux interactions liantes de type liaison H à l'intérieur de la poche de E2 (voir

figure 30.2) avec d'un côté, une molécule d'eau, de Glu353 et de Arg394, et de l'autre, une molécule de His 524 (Brzozowski et coll., 1997 ; Tanenbaum et coll., 1998). Néanmoins, la présence et la distance entre ces deux groupements hydroxyles ne sont pas les seuls facteurs critiques. En particulier, la nature des substituants liés au pont carbone peut déterminer l'activité œstrogénique. Par exemple, la substitution des groupements méthyles positionnés sur ce dernier, par des groupements hydrophiles provoque une baisse de l'activité œstrogénique, causée par la diminution de la force d'interaction avec la partie hydrophobe du récepteur (Kitamura et coll., 2005). Une autre expérience a montré que le remplacement des groupements CH_3 par des groupements CF_3, donnant lieu au bisphénol AF (BAF, 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl) hexafluoropropane), induit une baisse de l'activité (Okada et coll., 2008). En revanche, le remplacement des deux groupements méthyles par des chaînes propylées accroît l'expression des gènes et des protéines (Matsushima et coll., 2010).

L'importance du cycle benzénique B peut être évaluée en le remplaçant par des groupements alkyles. En effet, sa substitution par des groupements méthyles ou éthyles dérivés (4-tert-butylphénol et 4-tert-amylphénol) se matérialise par une baisse significative de l'activité, devenant ainsi inférieure à celle du 4-α-cumylphénol. Pour des chaines non volumineuses, l'interaction reste toutefois marquée (Okada et coll., 2008). Par conséquent, la présence d'un cycle aromatique suggère une interaction de type π-π ou XH-π (X=N,O,C) avec la poche du récepteur, interaction absente dans le cas de substituants alkyls. Enfin, la présence de substituants chlorés en position 3 ou 5 sur le cycle A a également un effet significatif sur l'activité, et permet de renforcer l'affinité de liaison avec le récepteur (Liu et coll., 2007). En effet, des dérivés chlorés peuvent se former lors du recyclage du papier thermique (par blanchissage à l'hypochlorite de sodium) qui sont 28 fois plus œstrogéniques que le BPA (Fukazawa et coll., 2002). Les requis structuraux sont résumés dans la figure 30.4.

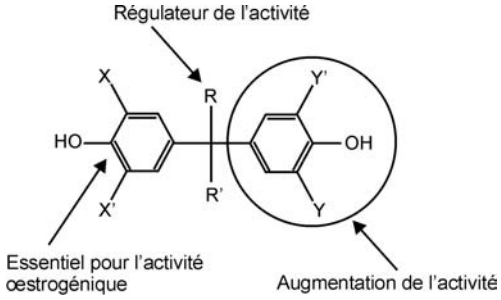


Figure 30.4 : Représentation des relations entre structure et propriétés pour le bisphénol

En conclusion, les bisphénols interagissent avec les mêmes récepteurs (ERα, ERβ ou ERRγ) que les œstrogènes naturels comme l'œstradiol (E2). Des études ont montré qu'il existe des relations bien définies entre les caractéristiques structurales et l'activité biologique des bisphénols. Des modèles QSAR permettent la détermination qualitative et/ou quantitative de l'activité œstrogénique en termes d'affinité et donnent des informations sur les mécanismes sous-jacents.

La présence d'un groupement aromatique hydroxylé (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe, caractéristiques essentielles pour l'activité œstrogénique, se retrouvent dans les bisphénols. La présence du groupement hydroxyle est fondamentale pour l'activité œstrogénique. La présence d'un second groupement fonctionnel à base d'oxygène (hydroxyle, cétone, ou carbonyle), positionné sur la partie terminale de la molécule, en opposition au cycle phénolique, confère ou du moins augmente l'activité œstrogénique. C'est le cas du BPA et du bisphénol F (BPF, 4,4'-Methylenbisphénol) du bisphénol A dimethacrylate (BIS-DMA) et du bisphénol-A-bis chloroformate (BPACF). Ces substances montrent une activité œstrogénique lors des tests de prolifération et d'induction protéique.

Par ailleurs, la nature des substituants liés au pont carbone peut déterminer l'activité œstrogénique. Par exemple, la substitution des groupements méthyles positionnés sur ce dernier, par des groupements hydrophiles provoque une baisse de l'activité œstrogénique, causée par la diminution de la force d'interaction avec la partie hydrophobe du récepteur. La substitution du cycle benzénique B par des groupements méthyles ou éthyles dérivés (4-tert-butylphénol et 4-tert-amylphénol) se traduit par une baisse significative de l'activité. En revanche, le remplacement des groupements CH_3 par des groupements CF_3 (bisphénol AF) ou encore le remplacement des deux groupements méthyles par des chaînes propylées accroît l'expression des gènes et des protéines.

La présence de substituants chlorés en position 3 ou 5 sur le cycle A a également un effet significatif sur l'activité. Les dérivés chlorés qui peuvent se former lors du recyclage du papier thermique (par blanchissage à l'hypochlorite de sodium) sont 28 fois plus œstrogéniques que le BPA.

Bibliographie

AGATONOVIC-KUSTRIN S, TURNER JV. Molecular structural characteristics of estrogen receptor modulators as determinants of estrogen receptor selectivity. *Mini-Rev Med Chem* 2008, **8** : 943-951

ANSTEAD GM, CARLSON KE, KATZENELLENBOGEN JA. The estradiol pharmacophore : ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997, **62** : 268-303

BRZOZOWSKI A, PIKE A, DAUTER Z, HUBBARD R, BONN T, et coll. Molecular basis of agonism and antagonism in the œstrogen receptor. *Nature* 1997, **389** : 753-758

COLEMAN KP, TOSCANO WA, WIESE TE. QSAR Models of the in vitro Estrogen Activity of Bisphenol A Analogs. *QSAR Comb Sci* 2003, **22** : 78-88

DEVILLERS J, MARCHAND-GENESTE N, CARPY A, PORCHER JM. SAR and QSAR modeling of endocrine disruptors. *SAR QSAR Env Res* 2006, **17** : 393-412

DODDS EC, LAWSON W Synthetic estrogens without the phenanthrene nucleus. *Nature* 1936, **137** : 996

FANG H, TONG W, SHI LM, BLAIR R, PERKINS R, et coll. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 2001, **14** : 280-294

FUKAZAWA H, WATANABE M, SHIRAISHI H, SHIOZAWA T, MATSUSHITA H, et coll. Formation of Chlorinated Derivatives of Bisphenol A in Waste Paper Recycling Plants and Their Estrogenic Activities. *J Health Sci* 2002, **48** : 242-249

FUKUZAWA K, KITAURA K, UEBAYASI M, NAKATA K, KAMINUMA T, NAKANO T. Ab initio quantum mechanical study of the binding energies of human estrogen receptor alpha with its ligands : an application of fragment molecular orbital method. *Comput Chem* 2005, **26** : 1-10

GAO H, KATZENELLENBOGEN JA, GARG R, HANSCH C. Comparative QSAR analysis of estrogen receptor ligands. *Chem Rev* 1999, **99** : 723

JENSEN GE, NIEMELÄ JR, WEDEBYE EB, NIKOLOV NG. QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use--a preliminary investigation. *SAR QSAR Env Res* 2008, **9** : 631-641

KADOWAKI T, WHEELOCK CE, ADACHI T, KUDO T, OKAMOTO S, et coll. Identification of endocrine disruptor biodegradation by integration of structure-activity relationship with pathway analysis. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 7997-8003

KITAMURA S, SUZUKI T, SANOH S, KOHTA R, JINNO N, et coll. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Tox Sc* 2005, **84** : 249-259

LIU H, PAPA E, GRAMATICA P. QSAR prediction of estrogen activity for a large set of diverse chemicals under the guidance of OECD principles. *Chem Res Toxicol* 2006, **19** : 1540-1548

LIU H, PAPA E, WALKER J, GRAMATICA P. In silico screening of estrogen-like chemicals based on different nonlinear classification models. *Mol Grap Mod* 2007, **26** : 135-144

OKADA H, TOKUNAGA T, LIU X, TAKAYANAGI S, MATSUSHIMA A, SHIMOHIGASHI Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Env Health Persp* 2008, **116** : 32-38

RONCAGLIONI A, BENFENATI E. In silico-aided prediction of biological properties of chemicals : œstrogen receptor-mediated effects. *Chem Soc Rev* 2008, **37** : 441-450

RONCAGLIONI A, PICLIN N, PINTORE M, BENFENATI E. Binary classification models for endocrine disrupter effects mediated through the estrogen receptor. *SAR QSAR Env Res* 2008, **19** : 697-733

SHI L, FANG H, TONG W, WU J, PERKINS R, et coll. QSAR models using a large diverse set of estrogens *J Chem Inf Comput Sci* 2001 **41** : 186

SIPPL W. Receptor-based 3D QSAR analysis of estrogen receptor ligands--merging the accuracy of receptor-based alignments with the computational efficiency of ligand-based methods. *Comp Aid Mo Des* 2000, **14** : 559-572

SOTO A, SONNENSCHEIN C, CHUNG K, FERNANDEZ MF, OLEA N, SERRANO FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens : an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 113-122

TANENBAUM DM, WANG Y, WILLIAMS SP, SIGLER PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95** : 5998-6003

TONG W, FANG H, HONG H, XIE Q, PERKINS R et coll. Regulatory application of SAR/QSAR for priority setting of endocrine disruptors : A perspective *Pure Appl Chem* 2003, **75** : 2375-2388

WALLER CLJ. A comparative QSAR study using CoMFA, HQSAR, and FRED/SKEYS paradigms for estrogen receptor binding affinities of structurally diverse compounds. *Chem Inf Comput Sci* 2004, **44** : 758-765

31
Autres modèles d'études

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

Modèles génétiquement modifiés, études *in vitro*

Chez les mammifères

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

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

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

Tableau 31.I : Effet du BPA dans divers modèles *in vivo*

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

Ip : intra-péritonéal ; Vo : voie orale

Chez les poissons téléostéens et les amphibiens

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

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

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

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

Études chez les poissons téléostéens

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

Activation des récepteurs nucléaires des œstrogènes

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

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

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

Différents tests

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

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

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

Autres approches

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bibliographie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

32
Conclusions et perspectives de recherche

En dépit de sa faible persistance environnementale, le BPA est présent dans les tissus d'une large majorité de la population générale comme en attestent les mesures effectuées dans les échantillons de plasma ou d'urine. Cette contamination ubiquiste s'explique par les niveaux très élevés de production mondiale de cet agent chimique ainsi que par sa très large utilisation dans les emballages alimentaires, les produits ménagers ou industriels. Une fois absorbé, le BPA est distribué dans l'ensemble de l'organisme et rapidement métabolisé en conjugués inactifs, avant d'être éliminé. Le BPA est capable de franchir les barrières placentaires et hémato-encéphaliques. Les agences d'évaluation du risque considèrent que l'exposition au BPA provient principalement de la contamination des aliments ingérés. L'analyse des données de toxicocinétiques réalisées chez le rongeur, le singe ou l'homme, d'une part et les concentrations observées dans les urines ou le plasma de la population générale d'autre part, font cependant apparaître certaines incohérences, suggérant une sous-estimation de l'exposition ou une surestimation des résidus plasmatiques et/ou urinaires mesurés dans la population humaine.

Les études épidémiologiques portant sur les effets du BPA sur la fonction de reproduction sont peu nombreuses et généralement réalisées à partir d'un effectif modeste. Celles qui ont été conduites chez la femme portent sur les taux d'hormones, l'endométriose, le cancer du sein et la survenue de fausses couches spontanées, et reposent sur des approches rétrospectives. Elles ne permettent pas de tirer de conclusions claires sur l'éventualité d'un lien entre ces pathologies (ou modifications physiologiques) et l'exposition au BPA. Les travaux réalisés à partir de sujets masculins mettent en évidence une corrélation entre les taux urinaires de métabolites du BPA et les niveaux circulants d'hormones gonadotropes et gonadiques, les dysfonctionnements sexuels, ou encore les caractéristiques spermatiques. En dépit de contradictions observées entre les études et d'approches transversales, peu adaptées à ce type d'étude, les résultats obtenus justifient la réalisation de travaux supplémentaires sur les effets du BPA sur la qualité du sperme et l'activité sexuelle. Pour tenir compte des enseignements de l'expérimentation animale et de l'importance de la période d'exposition *in utero*, il conviendrait de réaliser à partir des populations de taille importante, un suivi régulier des expositions chez la femme enceinte puis un suivi sanitaire de sa descendance.

De nombreuses études fondées sur de faibles doses (< NOAEL) ont été réalisées chez les rongeurs en privilégiant une fenêtre d'exposition prenant en compte la vie *in utero* et la période de lactation. Plusieurs d'entre elles partent de l'hypothèse que le mode d'action du BPA passe par son activité œstrogéno-mimétique et utilisent des estrogènes naturels ou de synthèse comme témoin positif. Chez les mâles, alors que des effets nuls ou limités sont observés sur la plupart des paramètres morphométriques pris en compte dans les études de reprotoxicité, plusieurs études montrent des effets significatifs du BPA à faibles doses sur les niveaux hormonaux ou la qualité du sperme de la génération F1, voire sur la fertilité des générations suivantes. Chez les femelles, les publications récentes sont hétérogènes en matière de mode d'administration, de période d'exposition ou de contrôle des facteurs confondants tels que la présence d'œstrogènes dans l'aliment. Elles montrent néanmoins que le BPA administré à faibles doses pendant des périodes critiques de développement a des effets sur l'âge de la puberté, le tractus génital, la fonction ovarienne, et le comportement des animaux. Il faut cependant s'interroger sur la pertinence du modèle rongeur pour l'extrapolation à l'homme de tels effets, compte tenu des spécificités du modèle rongeur en matière de placentation, de cyclicité sexuelle et de régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade, ou encore de la mise en place de la spermatogénèse. Il conviendrait donc de pouvoir disposer d'études réalisées chez d'autres espèces animales plus proches de l'Homme et de mettre en œuvre des approches permettant d'avoir accès à des paramètres plus fins que ceux basés sur la morphogenèse.

Les travaux menés chez les rongeurs sur l'impact tissulaire et cellulaire du BPA font état de lésions pré-néoplasiques de la prostate ou de la glande mammaire chez des animaux traités en période prénatale ou néonatale. Ces lésions témoignent d'une altération durable de la programmation de ces tissus et relèvent, au moins pour partie, de mécanismes liés à l'expression des récepteurs ER ou AR. De façon plus générale, le lien qui pourrait exister entre l'exposition au BPA et certains cancers hormonaux dépendant est mal documenté. Cela tient pour beaucoup au fait que les études de cancérogénèse ne prennent que très rarement en compte des expositions *in utero* ou au cours des premières semaines de la vie. Comme cela est suggéré dans le rapport récent FAO/OMS, la sensibilité particulière au BPA durant la période prénatale ou néonatale impose de revoir ces protocoles afin de réaliser une étude de long terme avec une exposition commençant au cours de la gestation et se poursuivant pendant 2 ans pour évaluer l'impact sur la glande mammaire et la prostate. Un suivi de la dose interne chez ces animaux est également indispensable si l'on veut pouvoir extrapoler les données à l'Homme.

Beaucoup de travaux se sont orientés vers les propriétés œstrogéniques du BPA pour en expliquer les effets. Ces propriétés largement démontrées *in vitro* et *in vivo* indiquent une liaison de faible affinité (plusieurs milliers de fois inférieure à celle de l'œstradiol) pour les récepteurs nucléaires ERα et β, peu compatibles avec des effets observés à faible dose et parfois avec des temps de

réponse très courts. Les études récentes indiquent que le BPA se lie à des formes membranaires des récepteurs des œstrogènes (GPR30, mbER) ainsi qu'à d'autres récepteurs nucléaires (ERRγ) avec une affinité bien plus importante que pour ERα et β. Cette voie de recherche innovante, pourrait conduire à expliquer les effets à faibles doses du BPA ainsi que certaines courbes dose-réponse non monotones. Des études utilisant des animaux dont ces récepteurs seraient invalidés permettraient de déterminer l'implication de ces autres cibles du BPA dans ses effets de perturbation endocrine.

La question de la nocivité pour l'Homme du BPA à faible dose reste donc posée et si des travaux récents ont fait progresser les connaissances sur le mode d'action de cette substance et ouvert de nouvelles voies de recherche, ils ne permettent en dépit de leur nombre important de cerner de façon précise le risque encouru par la population générale. Si les alternatives existent pour la plupart des utilisations du BPA, plusieurs d'entre elles reposent sur des analogues du BPA tels que les bisphénols B, E, F, S, qui sont déjà utilisés. Si leur propriétés œstrogéniques ont été étudiées, montrant également des effets faiblement œstrogéniques, les études de reprotoxicité sont très fragmentaires, voire inexistantes. Il parait donc urgent de disposer de données comparées pour les différents bisphénols afin d'éclairer les instances d'évaluation et de gestion du risque sur l'opportunité d'un recours à ces alternatives.

VI
Phtalates

Introduction

Les phtalates ou esters phtaliques sont le produit d'estérification d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools. Ils sont globalement caractérisés par une structure chimique incluant un cycle benzénique substitué en ortho par deux groupements carboxylates dont la taille des chaînes alkyles est variable. Selon l'alcool d'estérification, on distingue des esters phtaliques symétriques où les deux fonctions acides sont estérifiées par le même alcool (DEHP, DBP), dissymétriques où les deux fonctions acides sont estérifiées par des alcools différents (BBP), et non totalement définis lorsque les fonctions acides sont estérifiées par des alcools de type oxo (DINP, DIDP) (figure 1, tableau I).

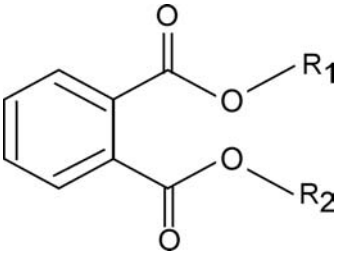


Figure 1 : Structure chimique de base des phtalates

Tableau I : Identité des principaux phtalates

R_1	R_2	Nom[a]	Abréviation	N° CAS	Poids moléculaire	LogK[b]
CH_3	CH_3	Diméthyl-phtalate	DMP	1316-11-3	194,2	1,47-2,12
C_2H_5	C_2H_5	Diéthyl-phtalate	DEP	84-66-2	222,2	2,47-2,51
C_8H_{17}	C_8H_{17}	Di(2-éthyl-hexyl)-phtalate	DEHP	117-81-7	390,6	7,5
C_8H_{17}	C_8H_{17}	Di(2-éthyl-hexyl)-terephtalate	DEHT	6422-86-2	390,6	
C_4H_9	C_4H_9	Dibutyl-phtalate	DBP	84-74-2	278,3	4,57
C_4H_9	C_4H_9	Diisobutyl-phtalate	DIBP	84-69-5	278,3	4,11
C_9H_{20}	C_9H_{20}	Diisononyl-phtalate	DINP	28553-12-0 68515-48-0	418,6	8,8
$C_{10}H_{21}$	$C_{10}H_{21}$	Diisodécyl-phtalate	DIDP	26761-40-0 68515-49-1	447,0	8,8
C_4H_9	C_7H_7	Butylbenzyl-phtalate	BBP	85-68-7	298,3	4,84

[a] Nom des phtalates selon la nomenclature anglosaxonne, choisie pour sa correspondance directe avec les abréviations les plus utilisées ; [b] Coefficient de partition eau/octanol d'après NICNAS, 2008

Parmi les phtalates les plus couramment utilisés, outre le DEHP, mentionnons le BBP, le DBP, le DEP et le DINP (tableau II).

Tableau II : Exemples d'utilisation des phtalates en Europe

Abréviation	Utilisation
DEP	Cosmétiques, solvants
DEHP	Câbles électriques, films plastiques, revêtements, matériel médical
DBP	Emballage, cosmétiques, encres, colles et adhésifs
DINP	Câbles électriques, revêtements, industrie automobile, semelles, emballages alimentaires
DIDP	Câbles électriques, revêtements, peintures, matériel médical
BBP	Revêtements de sol, matériaux d'isolation, traitement du cuir et des textiles

Les phtalates sont produits et utilisés depuis une cinquantaine d'années. La production mondiale de phtalates est passée de 1,8 million de tonnes en 1975 à 4,3 millions de tonnes en 2006 (Peijnenburg et Struijs, 2006), le quart étant représenté par le di-(2-éthyl-hexyl)-phtalate (DEHP) qui entre dans la composition finale du chlorure de polyvinyle (PVC). En France, ce composé est produit à raison de 60 000 tonnes par an à Chauny dans l'Aisne, soit 10 % de la production européenne (Ineris, 2005).

Des interdictions et restriction d'usage ont été promulguées par la Commission européenne : dans les préparations à destination du grand public (peintures et colles...), tous les phtalates classés CMR1 et 2 sont interdits ; concernant les articles, interdiction du DEHP, DBP et BBP dans la production des jouets et les articles pour enfants ; interdiction du DINP, DIDP et DNOP (di-n-octyl phtalate) pour les jouets des enfants de moins de trois ans (décision 2005/84/CE). Les phtalates tels que le DBP, DEHP, BBP ne sont pas autorisés dans les produits cosmétiques (Directive 2004/93/CE) ; le DEHP est interdit dans les matériaux de contact alimentaires (Directive 2007/19/CE). L'usage du DEHP dans les dispositifs médicaux est restreint si les nouveau-nés, les femmes enceintes et allaitant, doivent y être exposés (Directive 2007/47/CE).

Ces interdictions et restriction d'usage font suite à des travaux conduits chez le rongeur montrant des effets reprotoxiques du DEHP, du DBP et du BBP (classement en CMR2). Aujourd'hui, la communauté scientifique s'intéresse aux phtalates en tant que perturbateurs endocriniens, notamment en lien avec des troubles de la reproduction. La raison pour laquelle de nombreux travaux ont porté sur les phtalates au cours des années 1980 était liée aux effets cancérogènes du DEHP (prolifération de peroxysomes, augmentation de la masse du foie et survenue d'hépatocarcinomes après une exposition prolongée) chez les rongeurs, effets dont on a pu démontrer depuis qu'ils n'étaient pas extrapolables à l'homme.

Bibliographie

INERIS. Di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France, 2005

NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME (NICNAS). Existing Chemical Hazard Assessment Report. Phthalates Hazard Compendium. Australian Government, Department of Health and Aging. Sydney, Australia. June 2008. www.nicnas.gov.au/

PEIJNENBURG WJ, STRUIJS J. Occurrence of phthalate esters in the environment of The Netherlands. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006, **63** : 204-215

33
Exposition des populations

L'exposition humaine aux phtalates est importante et croît régulièrement en raison de la très large utilisation qui est faite de cette famille de composés et du fait de l'augmentation des niveaux de production au cours des trente dernières années.

On retrouve des phtalates dans plusieurs produits de consommation courante tels les adhésifs, les revêtements de sol en vinyle, les huiles lubrifiantes, les condensateurs électriques, les détergents, les solvants, les produits pharmaceutiques, les fils et les câbles électriques et les produits cosmétiques (parfums, déodorants, lotions après rasage, shampooings, aérosols pour cheveux, vernis à ongles...). La particularité des phtalates utilisés en plasturgie tient au fait qu'ils ne sont pas liés de manière covalente aux polymères auxquels ils confèrent leur souplesse. Ils peuvent donc facilement migrer dans les matériaux d'emballages et être relargués dans le milieu environnant, en particulier lorsque les plastiques qui en contiennent sont soumis à des températures élevées.

L'exposition environnementale aux phtalates peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou encore la nourriture et résulte à la fois de l'inhalation, de l'ingestion ou encore de l'absorption percutanée de ces produits.

L'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des emballages contenant des phtalates demeure la principale source d'exposition pour la population générale. L'alimentation est la principale voie d'exposition pour le DEHP, DBP et DIBP.

Les dispositifs médicaux (poches de sang, tubulures...) représentent pour certains sous-groupes de la population une source non négligeable d'exposition aux phtalates, en particulier au DEHP. L'exposition via les dispositifs médicaux touche principalement les hémodialysés, les donneurs et receveurs de plaquettes et les enfants prématurés (Calafat et coll., 2004 ; Koch et coll., 2005). *L'European Chemicals Bureau* (ECB) estimait en 2008 que l'exposition pouvait atteindre 3,1 mg/kg pc/j, chez les hémodialysés adultes et 1,7 mg/kg pc/j chez les nouveau-nés transfusés.

Exposition des populations

Exposition en population générale

L'exposition aux phtalates, calculée sur la base des métabolites urinaires (Wittasek et coll., 2007a) montre que les niveaux médians pour la population

générale (60 sujets âgés de 20 à 28 ans) en 2003 atteignaient en Allemagne 2,4 µg/kg pc/j pour le DEHP, 1,9 µg/kg pc/j pour le DBP, 1,4 µg/kg pc/j pour le DIBP, 0,4 µg/kg pc/j pour le DINP et 0,2 µg/kg pc/j pour le BBP. Des valeurs similaires ont été trouvées par Wittassek et Angerer (2008) chez 102 sujets allemands âgés de 6 à 80 ans. À partir de différents scénarios, Wormuth et coll. (2006) ont comparé les expositions journalières aux 8 principaux phtalates en fonction de l'âge et du sexe (tableau 33.I). Les valeurs obtenues font apparaître une exposition globalement plus élevée chez les enfants que chez les adultes (valeurs exprimées en fonction du poids corporel), mais peu de différences entre hommes et femmes.

En France, l'étude pilote « Elfe » (Étude longitudinale depuis l'enfance), réalisée sur les départements de Seine Saint-Denis, Ardèche, Loire, Isère et Savoie en octobre 2007 a permis de recueillir 279 échantillons d'urine chez les mères en salle de naissance. Les dosages de métabolites du DEHP, MEHP et ses dérivés (5-OH-MEHP et 5-oxo-MEHP) ont été réalisés à la suite d'une hydrolyse enzymatique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).

Les résultats ont montré une présence de phtalates chez 100 % des femmes. Les taux ont pu être quantifiés chez plus de 90 % des femmes. Les valeurs médianes des concentrations étaient de 41,9 µg/l en 5-OH-MEHP, de 28,3 µg/l en 5-oxo-MEHP, de 13,7 µg/l en MEHP. Les concentrations médianes urinaires en MEHP et ses métabolites (5-OH-MEHP et 5-oxo-MEHP) sont similaires à celles retrouvées dans d'autres études (Vandentorren et coll., 2011).

Tableau 33.I : Estimation de l'exposition journalière aux phtalates, exprimée en µg/kg pc/j, prenant en compte l'ensemble des voies d'exposition (d'après Wormuth et coll., 2006)

	Enfants 0-12 mois (5,5 kg)		Enfants 1-3 ans (13 kg)		Enfants 4-10 ans (27 kg)		Femme 18-80 ans (60 kg)		Homme 18-80 ans (70 kg)	
	Moy	Max	Moy	Max	Moy	Max	Moy	Max	Moy	Max
DEHP	16,16	135,28	6,31	62,10	1,97	17,44	2,54	14,71	2,85	16,32
BBP	0,76	7,56	0,31	3,67	0,06	1,24	0,27	1,65	0,31	1,89
DINP	21,98	135,02	7,07	67,19	0,19	5,61	0,00	0,26	0,00	0,29
DIDP	1,43	8,99	0,51	4,24	0,02	0,47	0,00	0,08	0,00	0,09
DIBP	1,57	5,58	0,68	2,62	0,29	1,25	0,41	1,45	0,45	1,61
DEP	3,48	19,74	1,49	8,31	0,76	4,44	1,43	64,93	1,15	50,94
DBP	7,60	44,92	2,55	25,42	1,23	17,01	3,53	38,56	3,61	18,57
DMP	1,81	23,46	0,76	9,72	0,49	6,28	0,22	2,54	0,22	2,68
Σ	54,80	380,57	19,68	183,28	5,00	53,73	8,42	124,17	8,59	92,38

Les évaluations de risque effectuées par l'EFSA sur le DEHP, le DBP, le DIDP, le BBP et le DINP ont abouti à une dose journalière tolérable (DJT) de respectivement 50, 10, 150, 500 et 150 µg/kg pc/j (EFSA 2005a, b, c, d).

En 2010, la *Consumer Product Safety Commission* américaine (CPSC) déterminait une DJT de 5,8 µg/kg pc/j pour le DEHP et de respectivement 200, 1 000, et 120 µg/kg pc/j pour le DBP, le BBP et le DINP (tableau 33.II). La principale différence entre ces deux évaluations du risque porte sur le DEHP et le DBP. Pour le DEHP, l'EFSA a basé son évaluation sur l'étude de Wolfe et Layton (2003) mettant en évidence, sur une étude multigénérationnelle menée chez le rat, la toxicité du DEHP sur le testicule et les cellules germinales. À partir de cette étude, la dose sans effet est estimée à 5 mg/kg pc/j et un facteur de sécurité de 100 a été appliqué. La CPSC a considéré l'étude de toxicité chronique chez le rat de David et coll. (2000) mettant en évidence un effet sur la spermatogenèse à partir de 5,8 mg/kg pc/j. Cette étude ne permettant pas de définir une dose sans effet, un facteur de sécurité de 1 000 a été appliqué. Pour ce qui concerne le DBP, la CPSC s'est fondée sur l'étude de reprotoxicité de Mahood et coll. (2007) permettant de définir une dose sans effet de 20 mg/kg pc/j et un facteur de sécurité de 100 a été appliqué. L'EFSA a, pour sa part, pris en compte l'étude de Lee et coll. (2004) qui montre un effet sur le développement chez le rat à partir de 2 mg/kg pc/j. L'application d'un facteur de sécurité de 200 a conduit à une DJT de 10 µg/kg pc/j.

Tableau 33.II : DJT établies d'après les évaluations de risques

Phtalate	Évaluations	Étude de référence	NOAEL ou LOAEL (mg/kg/j)	DJT (µg/kg pc/j)
DEHP	EFSA	Wolfe et Layton, 2003	NOAEL : 5	50
	CPSC	David et coll., 2000	LOAEL : 5,8	5,8
DBP	EFSA	Lee et coll., 2004	LOAEL : 2	10
	CPSC	Mahood et coll., 2007	NOAEL : 20	200
BBP	EFSA	Tyl et coll., 2001 et 2004	NOAEL : 50	500
	CPSC	Aso et coll., 2005	NOAEL : 100[a]	1 000
DINP	EFSA	Exxon, 1986	NOAEL : 15	150
	CPSC	Lington et coll., 1997	NOAEL : 15[a]	120
DIDP	EFSA	Hazleton Laboratories, 1968	NOAEL : 15[a]	150

[a] Effets sur le foie

Exposition des enfants, nourrissons et nouveau-nés

L'exposition des enfants a fait l'objet de plusieurs études qui montrent toutes que ces derniers sont davantage exposés que les adultes. Dans une étude fondée sur les taux urinaires mesurés chez 239 enfants âgés de 2 à 14 ans, Wittassek et coll. (2007b) ont estimé les niveaux médians d'exposition au DEHP entre 4,3 et 7,8 µg/kg pc/j. L'EFSA estimait en 2005 que l'exposition au DEHP d'enfants de

plus de 6 mois consommant des aliments pour bébés prêts à l'emploi était, dans les cas les plus défavorables, de 23,5 µg/kg pc/j (EFSA, 2005a).

Une étude allemande (GerES IV) publiée en 2009 rapporte les concentrations urinaires en métabolites du DEHP ainsi que d'autres phtalates (DBP, DIBP, BBP, DINP) pour des enfants de 3 à 14 ans vivant en Allemagne (Becker et coll., 2009). Les concentrations en métabolites diminuent avec l'âge. Comparés aux adultes, tous les enfants présentent des concentrations 3 à 5 fois plus élevées que les adultes analysés dans le même temps. Les auteurs indiquent que 1,5 % des enfants en Allemagne présentent une exposition au DEHP supérieure au niveau d'exposition pour lequel l'absence d'effet adverse n'est pas certaine.

Hormis la situation particulière des nouveau-nés, notamment des prématurés placés en soins intensifs, l'exposition des nourrissons et des jeunes enfants aux phtalates provient essentiellement de la voie alimentaire. Quelques publications font état des teneurs en phtalates dans le lait maternel (Main et coll., 2006 ; Högberg et coll., 2008 ; Latini et coll., 2009). Elles montrent des différences interindividuelles importantes dont on ne peut exclure qu'elles puissent être dues en partie à des problèmes de contamination des échantillons avant ou pendant l'analyse. Ainsi, pour le DEHP, les teneurs rapportées par Högberg et coll. (2008) chez 42 femmes suédoises primipares dont le lait a été prélevé entre la 2e et la 3e semaine qui a suivi l'accouchement, varient de 0,45 à 305 µg/l, avec une valeur médiane de 9 µg/l.

Les difficultés analytiques concernant la quantification des phtalates a conduit les équipes à rechercher les métabolites, en particulier les monoesters, plutôt que les composés parents. Ces monesters sont en effet suffisamment lipophiles pour être éliminés dans le lait, contrairement à une grande partie des métabolites hydroxylés. Les concentrations de MEHP, métabolite du DEHP, varient de 0,5 à 6,5 µg/l dans l'étude de Högberg et coll. (2008) sur les femmes suédoises. Elles sont comprises entre 1,8 et 109 µg/l dans une étude conduite récemment sur 62 femmes italiennes (Latini et coll., 2009).

La concentration en phtalates a été mesurée dans les aliments lactés pour nourrissons ainsi que dans les aliments pour bébés vendus sur le marché danois (Petersen et coll., 2000). Les concentrations maximales retrouvées dans le lait maternisé étaient de 60 µg/kg pour le DEHP et de 10 µg/kg pour le BBP. Dans les aliments pour bébés, les teneurs en DEHP, DBP et BBP atteignaient au maximum respectivement 630, 40 et 5 µg/kg. Sur la base de ces valeurs, Müller et coll. (2003) ont estimé que l'exposition des nourrissons aux phtalates était de 9,8 et 1,6 µg/kg pc/j respectivement pour le DEHP et le BBP, alors que la consommation d'aliments prêts à l'emploi chez les enfants de plus de 6 mois conduisait à une exposition de 19,6 µg/kg pc/j pour le DEHP, de 1,25 µg/kg pc/j pour le DBP et de 0,16 µg/kg pc/j pour le BBP.

Exposition *in utero*

Des études montrent que l'exposition commence *in utero*. La présence de DEHP et de son métabolite le MEHP a été détectée dans le sang du cordon prélevé à la naissance chez 84 nouveau-nés dans le sud de l'Italie (Latini et coll., 2003). Les concentrations moyennes de DEHP et MEHP étaient respectivement de 1,19±1,15 µg/ml et 0,52±0,61 µg/ml. Plus récemment, Wittassek et coll. (2009) ont mesuré les concentrations de métabolites des principaux phtalates dans le liquide amniotique récupéré au cours de 11 naissances par césarienne ayant eu lieu à l'hôpital de Münster en Allemagne. Les métabolites les plus abondants sont le MBP (médiane=7,8 µg/l), le MIBP (médiane=4,2 µg/l), le MBzP (médiane=1,9 µg/l) et le MEHP (médiane=1,6 µg/l) qui correspondent respectivement au DBP, DIBP, BBP et DEHP. Ces valeurs sont 3 à 8 fois plus faibles que celles mesurées dans l'urine des mères prélevée au moment de l'accouchement.

Absorption, distribution, biotransformation, excrétion

Absorption

L'absorption des phtalates dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels la dose et la voie d'exposition ainsi que la masse moléculaire du composé lui-même. Les mesures réalisées chez les rongeurs exposés par voie orale à de faibles doses de phtalates indiquent que l'absorption gastro-intestinale est rapide et que les niveaux observés sont proches de 100 % pour le DBP et le BBP, et d'environ 50 % pour le DIDP, le DINP et le DEHP. Les travaux menés par Koch et coll. (2004, 2005) sur un volontaire sain à qui une dose orale unique de DEHP marqué au deutérium a été administrée indiquent que, chez l'homme, l'absorption de ce phtalate est d'environ 75 %.

S'il n'existe pratiquement pas de donnée quantitative sur l'absorption des phtalates par inhalation (seule une étude identifiée chez le rat indique qu'environ 1,5 % d'une concentration de 100 mg de DEHP/m^3, sous forme d'aérosol, est absorbé en 6 h ; ECB, 2008), quelques travaux ont permis d'établir les niveaux d'absorption cutanée des principaux phtalates chez le rat. Ces données sont résumées dans la figure 33.1 et montrent que si cette voie de passage est limitée pour les phtalates dont la masse moléculaire est proche de 400 ou supérieure à cette valeur, elle est loin d'être négligeable pour les molécules de plus faible encombrement stérique. Les études conduites chez l'homme avec du ^{14}C-DEHP (Wester et coll., 1998) font état d'un niveau d'absorption cutanée d'environ 1 %, estimé sur la base de la quantité de radioactivité retrouvée dans l'urine. Cette valeur ne tenant pas compte des autres voies d'élimination, en particulier biliaire, sous-estime probablement la réalité. De ce fait, l'ECB (2008) propose de retenir une biodisponibilité de 5 % pour le DEHP appliqué sur la peau.

Distribution

Dans l'organisme, la distribution est rapide et dépend de la voie d'administration. Pour ce qui concerne le DEHP, les données expérimentales recueillies chez l'animal indiquent que les résidus (DEHP inchangé + métabolites) sont principalement localisés dans le foie, l'intestin, le tissu adipeux et le rein, sans que soit observé un écart important entre les différents tissus, ni une accumulation de la molécule (ATSDR, 2002). Les concentrations retrouvées dans le cerveau et les testicules sont faibles. Des résidus de DEHP ont été détectés dans le foie des fœtus de rats dont la mère avait été traitée par gavage durant la gestation, démontrant la capacité du DEHP à traverser la barrière placentaire (Srivastava et coll., 1989 ; Stroheker et coll., 2006). Lors d'expositions par inhalation ou par injection intraveineuse, c'est généralement le poumon qui est le principal tissu cible, suivi par le foie et le rein.

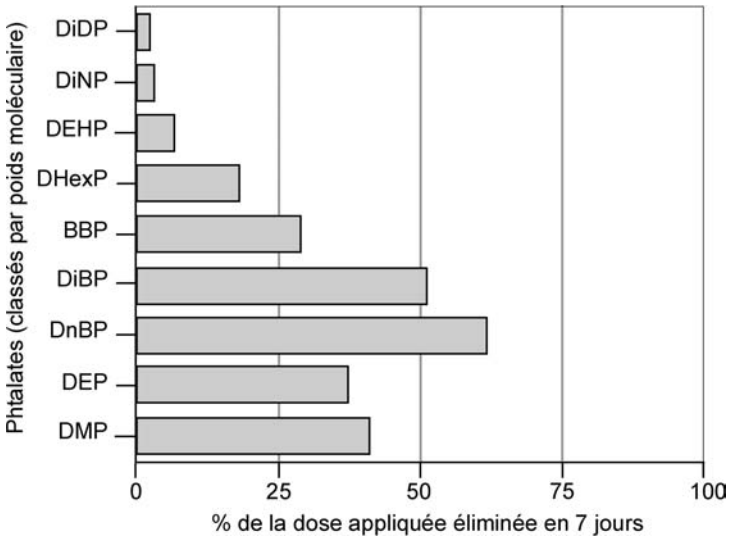


Figure 33.1 : Absorption cutanée des phtalates chez le rat (d'après El Sisi et coll., 1989 et McKee et coll., 2002)

Les études effectuées sur d'autres phtalates sont peu nombreuses. Elles indiquent néanmoins que la distribution se fait dans l'ensemble des tissus, sans véritable prééminence pour un organe particulier, ni rétention dans un tissu donné.

Biotransformation/métabolisme

La biotransformation des phtalates, substances très lipophiles, en produits capables d'être éliminés rapidement requiert la mise en œuvre de plusieurs voies métaboliques qui sont, dans leurs grandes lignes, communes à l'ensemble des diesters de l'acide phtalique ayant des chaînes alkyles saturées (figure 33.2). Ces

voies se retrouvent exprimées de manière sensiblement analogue chez les espèces de mammifères, incluant l'homme, chez lesquelles elles ont été étudiées. Les différences observées sont davantage quantitatives que qualitatives. La première étape de ce métabolisme est l'hydrolyse du dialkyl phtalate en monoester sous l'action des estérases présentes notamment dans le tube digestif. Ainsi, sous l'action de la lipase pancréatique, le DEHP est hydrolysé en MEHP, libérant la chaîne alkyle sous la forme d'un alcool primaire. En revanche, la lipase n'est pas en mesure d'hydrolyser la seconde liaison ester et de produire l'acide phtalique. Cette deuxième hydrolyse ne peut se produire qu'en présence d'une estérase hépatique localisée dans le réticulum endoplasmique (Albro, 1986). Cette première étape n'est pas véritablement une réaction de détoxication. En effet, les dérivés monoesters sont souvent plus toxiques que le phtalate de départ (Frederiksen et coll., 2007). C'est en particulier le cas du MEHP, plus actif que le DEHP dont il est issu, notamment en matière de liaison au récepteur PPARα et de reprotoxicité (ECB, 2008). Les monoesters subissent ensuite une oxydation sur la chaîne alkyle qui peut avoir lieu sur le carbone terminal (oxydation en ω) ou subterminal (ω-1), mais aussi en position ω-2 (non indiqué dans la figure 33.2). Ces oxydations sont produites par l'action des monooxygénases cytochrome P450 dépendantes. D'autres étapes d'oxydation peuvent avoir lieu, catalysées principalement par les aldéhydes deshydrogénases, et conduire à la formation d'un dérivé oxo ou d'un aldéhyde ; ce dernier, pris en charge par l'aldéhyde deshydrogénase, donne lieu à un acide. Le métabolite carboxylé peut ensuite subir une série de β-oxydations ou de décarboxylations ce qui a pour effet de réduire la longueur de la chaîne carboxylée (Kato et coll., 2007 ; CPSC, 2010). Pour les phtalates ayant une chaîne alkyle ramifiée, comme c'est le cas pour le DEHP, le processus d'oxydation peut avoir lieu sur l'une ou l'autre des branches de la chaîne, ainsi que sur différents atomes de carbone, ce qui se traduit par un nombre important de métabolites différents (plus de 30 pour le DEHP). Les phtalates monoesters ainsi que les métabolites hydroxylés ou oxydés peuvent être éliminés sous cette forme ou après conjugaison à l'acide glucuronique.

Concernant le DEHP, la principale différence de métabolisme entre le rat et les primates tient au fait que le métabolisme oxydatif du MEHP conduisant à la formation d'acides dicarboxyliques est une voie majoritaire chez le rat, alors que chez les primates et chez l'homme, ce sont principalement le MEHP et les alcools secondaires correspondants que l'on retrouve de façon prépondérante (Kavlock et coll., 2002a). Une autre différence interespèce concerne la conjugaison des métabolites primaires à l'acide glucuronique avant leur élimination urinaire. Alors qu'aucun glucuronide n'est présent dans l'urine chez le rat, ils représentent environ 60 % des métabolites urinaires chez la souris et 65 à 99 % chez les primates et chez l'homme (ECB, 2008). Pourtant, comme l'a montré Albro (1986) par des études *in vitro*, les microsomes hépatiques de rat sont bien capables de réaliser la conjugaison. Cet auteur explique la différence de glucuronide urinaire chez les rongeurs par le fait que la β-glucuronidase hépatique, enzyme réalisant l'hydrolyse du glucuronide, est 3 fois plus active

chez le rat que chez la souris. Pour mieux appréhender ces différences interespèces, Ito et ses collaborateurs (2005) ont mesuré les activités des principales enzymes du métabolisme du DEHP (lipase, UDPGT, alcool deshydrogénase et aldéhyde deshydrogénase) dans plusieurs organes (foie, poumons, rein, intestin grêle) chez la souris CD1, le rat Sprague-Dawley et le singe marmouset. La lipase intestinale, principale responsable de la formation de MEHP, est environ 350 fois plus active chez la souris que chez le marmouset. Les résultats sur les autres enzymes font apparaître des différences bien plus limitées.

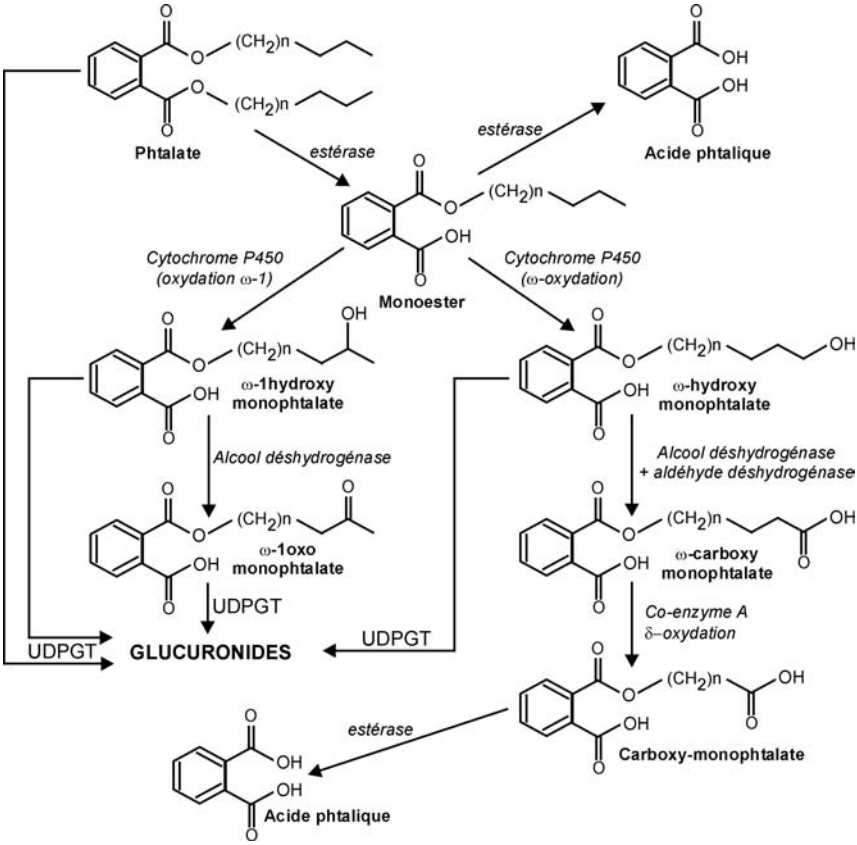


Figure 33.2 : Principales voies métaboliques des phtalates chez les mammifères (d'après Albro, 1986 ; Silva et coll., 2003 ; Frederiksen et coll., 2007)
UDPGT : Uridine 5′-diphosphoglucuronyl transférase

Excrétion

Les métabolites des phtalates sont rapidement éliminés. Leur demi-vie est généralement comprise entre 8 et 48 h selon le composé. Le tableau 33.III présente les métabolites des principaux phtalates. Pour les phtalates qui ont

un faible poids moléculaire, comme le DMP ou le DEP, chez le rat comme chez l'homme, l'essentiel de l'élimination se produit dans l'urine sous forme de métabolites monoesters non conjugués (Frederiksen et coll., 2007). Le DBP est lui aussi principalement éliminé dans l'urine. Plus de 80 % d'une dose unique de DBP chez le rat est excrété dans l'urine en 48 h contre 5 % dans les fèces (Williams et Blanchfield, 1975), le glucuronide du monobutylphtalate étant le principal métabolite urinaire du DBP. Le DIBP et le BBP ont des profils d'excrétion semblables à celui du DBP. Ainsi, seulement 7 % du MBP urinaire est sous forme non conjuguée chez l'homme (Silva et coll., 2003). Pour les phtalates de poids moléculaire plus élevé comme le DINP, l'élimination est autant fécale qu'urinaire (McKee et coll., 2002). Chez le rat, une partie substantielle de l'élimination fécale est due à l'excrétion de métabolites biliaires. En effet, le ratio urine/fèces est sensiblement le même, que le DINP soit administré par voie orale ou par voie cutanée (ECB, 2003). Pour la plupart des phtalates, un cycle entérohépatique a été mis en évidence.

Pour ce qui concerne le DEHP, Koch et coll. (2004, 2005) ont observé que 2 jours après l'administration orale d'une dose unique de DEHP deutéré (0,35, 2,15 et 48,5 mg) à un volontaire sain, environ 75 % de la dose était éliminée dans l'urine, sous forme de 5 métabolites principaux : le mono(2-éthyl-5-hydroxyhexyl) phtalate (MEHHP ou 5OH-MEHP), le mono(2-éthyl-5-carboxypentyl phtalate (MECPP ou 5cx-MEPP), le mono(2-éthyl-5-oxohexyl) phtalate (MEOHP ou 5oxo-MEHP), le MEHP et le mono(2-carboxyméthylhexyl) phtalate (MCMHP ou 2cx-MMHP), représentant respectivement 24,7, 21,9, 14,9, 7,3 et 5,4 %. La dose, dans la gamme utilisée, a très peu d'incidence qualitative ou quantitative sur ce profil d'excrétion. Quelques métabolites mineurs tels que le mono(2-éthyl-3-carboxypropyl)-phtalate, le mono(2-éthyl-4-carboxybutyl)-phtalate et le mono[2-(1-oxoéthyl)hexyl] phtalate sont également présents. Dans les études populationnelles, les métabolites urinaires principaux sont le MECPP et le MEHHP (Frederiksen et coll., 2007).

Tableau 33.III : Métabolites urinaires majeurs des dialkyl orthophtalates (d'après Frederiksen, 2007 ; NRC, 2008 et CPSC, 2010)

Parents	Abréviation	Métabolites	Abréviation 1[a]	Abréviation 2
Diméthyl-phtalate	DMP	Monométhyl-phtalate	MMP	
Diéthyl-phtalate	DEP	Monoéthyl-phtalate	MEP	
Di-n-butyl-phtalate	DBP	Mono n-butyl-phtalate	MBP	
Diisobutyl-phtalate	DIBP	Monoisobutyl-phtalate	MIBP	
Butylbenzyl-phtalate	BBP	Monobenzyl-phtalate	MBzP	
		Monobutyl-phtalate[b]	MBP	
Dicyclohexyl-phtalate	DCHP	Monocyclohexyl-phtalate	MCHP	

Parents	Abréviation	Métabolites	Abréviation 1[a]	Abréviation 2
Di(2-éthylhexyl)-phtalate	DEHP	Mono(2-éthylhexyl)-phtalate	MEHP	5oxo-MEHP
		Mono(2-éthyl-5-oxohexyl)-phtalate	MEOHP	5OH-MEHP
		Mono(2-éthyl-5-hydroxyhexyl)-phtalate	MEHHP	2cx-MMHP
		Mono(2-carboxyméthylhexyl)-phtalate	MCMHP	5cx-MEPP
		Mono(2-éthyl-5-carboxypentyl)-phtalate	MECPP	
Di-n-octyl-phtalate	DNOP	Mono-n-octyl-phtalate	MNOP	3cx-MNOP
		Mono(3-carboxypropyl)phtalate	MCPP	
Diisononyl-phtalate	DINP	Monoisononyl-phtalate	MINP	cx-MINP
		Mono(carboxyisooctyl)-phtalate	MCIOP	OH-MINP
		Mono(hydroxyisononyl)-phtalate	MHINP	oxo-MINP
		Mono(oxoisononyl)-phtalate	MOINP	
Diisodecyl-phtalate	DIDP	Monoisodecyl-phtalate	MIDP	cx-MIDP
		Mono(carboxyisononyl)-phtalate	MCINP	OH-MIDP
		Mono(hydroxyisodecyl)-phtalate	MHIDP	oxo-MIDP
		Mono(oxoisodecyl)-phtalate	MOIDP	
Di(2-propylheptyl)-phtalate	DPHP	Mono(propylheptyl)-phtalate	MPHP	cx-MPHP
		Mono(carboxypropylheptyl)-phtalate	MCPHP	OH- MPHP
		Mono(hydroxypropylheptyl)-phtalate	MHPHP	oxo-MPHP
		Mono(oxopropylheptyl)-phtalate	MOPHP	

[a] Les abréviations des métabolites ne sont pas encore standardisées. L'abréviation 1 dérive de la nomenclature anglosaxonne et l'abréviation 2 est couramment utilisée dans les publications ; [b] BBP est préferentiellement hydrolysé en monobenzyl phtalate

Koch et Angerer (2007) ont étudié l'excrétion urinaire du DINP chez un volontaire humain ayant reçu une dose orale unique (1,27 mg/kg pc) de DINP deutéré. Le métabolite majoritaire recueilli au cours des 2 jours suivant l'administration est le MHINP (OH-MINP), suivi du MCIOP (cx-MINP) et du MOINP (oxo-MINP). Le même type d'expérimentation menée avec du di(2-propylheptyl)-phtalate (DPHP) montre que les deux métabolites urinaires principaux de ce phtalate chez l'homme sont le MHPHP (OH-MPHP) et le MOPHP (oxo-MPHP) (Wittassek et Angerer, 2007). Une étude réalisée chez une centaine de volontaires adultes (exposition aux phtalates non connue) a montré que trois métabolites oxydés du DIDP étaient éliminés dans l'urine : le mono(carboxyisononyl) phtalate (MCINP ou cx-MIDP), le mono(oxoisodecyl)-phtalate (MOIDP ou oxo-MIDP) et le mono(hydroxyisodecyl)-phtalate (MHIDP ou OH-MIDP) (Silva et coll., 2007). La figure 33.3 résume les données concernant l'élimination urinaire des métabolites des phtalates chez l'homme et permet de faire apparaître les principaux marqueurs d'exposition à ces contaminants.

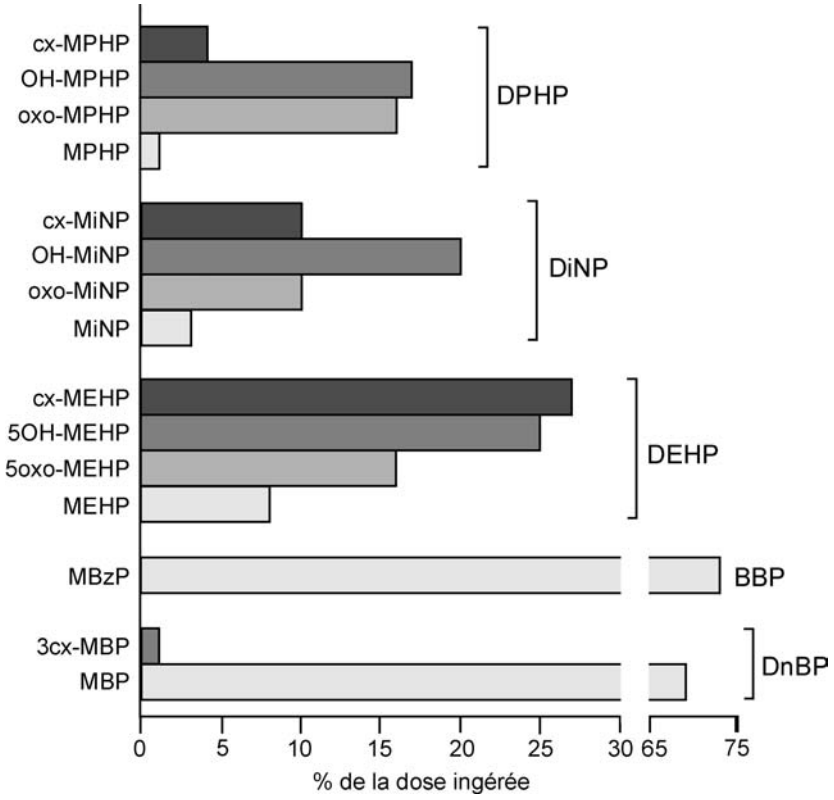


Figure 33.3 : Principaux métabolites urinaires des phtalates chez l'homme identifiés (d'après Wittassek et Angerer, 2007)

Dans cette figure, cx-MEHP repésente la somme de 5cx-MEPP et 2cx-MMHP.

Ces données indiquent que si les monoesters tels que le MBP ou le MBzP peuvent constituer des marqueurs urinaires pertinents de l'exposition humaine au DBP et au BBP, les monoesters de phtalates de masses moléculaires plus élevées ne suffisent pas à rendre compte d'une exposition aux phtalates dont ils sont issus. La mesure des métabolites oxydés comme biomarqueurs de l'exposition aux phtalates présente l'intérêt d'éviter les biais analytiques liés à la contamination des échantillons au cours du stockage, ou encore pendant les différentes étapes du processus d'analyse. En effet, contrairement aux monoesters qui peuvent se former, à partir des composés parents, par photolyse ou hydrolyse chimique, conduisant parfois à une surestimation de l'exposition, les produits d'oxydation sont uniquement issus du métabolisme par l'organisme et ne dépendent pas d'un facteur externe de contamination. Par ailleurs, ils ont généralement une demi-vie supérieure à celle des monoesters et peuvent donc mieux refléter un degré moyen d'exposition, tout au moins pour des phtalates disposant d'une chaîne ester d'au moins 5 atomes de carbone.

Dans la population générale, les concentrations médianes des métabolites mesurées par Angerer et ses collaborateurs sur un échantillon d'une centaine de personnes résidant dans le sud de l'Allemagne sont de 50,4 µg/l pour le MBP, 35,7 µg/l pour le MIBP, 5,4 µg/l pour le MBzP, 4,1 µg/l pour le MEHP, 13,8 µg/l pour le MEHHP, 12,2 µg/l pour le MEOHP, 21,6 µg/l pour le MECPP, 6,3 µg/l pour le MCMHP, 2,0 µg/l pour le MHINP, 1,3 µg/l pour le MOINP et 4,0 µg/l pour le MCIOP (Wittassek et Angerer, 2007). Ces profils d'excrétion peuvent varier en fonction des zones géographiques, mais également de l'âge. Chez les enfants de 6-7 ans, le ratio des produits d'oxydation du DEHP/MEHP est environ 4 fois plus élevé que chez l'adulte (Becker et coll., 2009). Chez les nouveau-nés, le MECPP est de loin le métabolite urinaire le plus abondant.

Plusieurs auteurs (David, 2000 ; Koch et coll., 2003 ; Suzuki et coll., 2009) ont estimé les valeurs d'exposition journalières en se basant sur l'analyse quantitative des métabolites urinaires et en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Dose journalière } (\mu g/kg/j) = \frac{ME\ (\mu g/g) \times CE(mg/kg/j) + 1}{F_{UE} \times 1\,000\ (mg/g)} \times \frac{MW_d}{MW_m}$$

dans laquelle ME est la concentration en monoester de phtalate ajustée au taux de créatinine, CE est le taux d'excrétion urinaire de créatinine normalisé en fonction du poids corporel et F_{UE} est la fraction molaire de monoester éliminée dans l'urine par rapport au phtalate diester parent. MW_d et MW_m représentent la masse moléculaire respective des diesters et des monoesters de phtalates.

Une bonne corrélation est généralement observée entre certains dérivés monoesters des phtalates urinaires et ceux détectés dans le sérum (Silva et coll., 2003 ; Högberg et coll., 2008 ; Hines et coll., 2009). Dans la plupart des cas cependant, les taux sériques sont trop faibles pour permettre une estimation correcte de l'exposition, expliquant la préférence de plusieurs équipes pour les marqueurs urinaires.

Outre l'urine, la bile constitue également une voie d'excrétion des phtalates. Les études de métabolisme réalisées chez les rongeurs à partir de DEHP, de BBP ou de DIDP radio-marqués (Kavlock et coll., 2002a, b, c) montrent que cette voie est moins importante que l'excrétion urinaire, même si elle peut atteindre plus de 50 % de la dose administrée par voie intraveineuse pour le BBP. Chez le rat traité par du DEHP par voie orale (500 mg/kg), le taux d'élimination biliaire est d'environ 5 à 10 % et concerne principalement des conjugués à l'acide glucuronique (Daniel et Bratt, 1974 ; Tanaka et coll., 1975). Plusieurs études font état d'un cycle entérohépatique pour les phtalates, mais la plupart des travaux apportent des preuves indirectes du processus, sans fournir pour autant de véritables données quantitatives.

Le lait est également une voie d'élimination des phtalates. Plusieurs travaux expérimentaux font état du transfert dans le lait des métabolites de phtalates.

Les données récentes recueillies chez des femmes européennes indiquent que les teneurs de plusieurs monoesters de phtalates dans le lait, bien que généralement faibles, sont parfaitement mesurables (Mortensen et coll., 2005 ; Main et coll., 2006 ; Högberg et coll., 2008 ; Hines et coll., 2009 ; Latini et coll., 2009). Parmi les monoesters, les concentrations les plus élevées sont observées pour le MINP avec des valeurs médianes de l'ordre de 100 µg/l chez des femmes scandinaves (Mortensen et coll., 2005 ; Main et coll., 2006) alors que Latini et coll. (2009) rapportent des valeurs médianes inférieures à 20 µg/l chez 62 femmes du sud de l'Italie. Les valeurs observées pour les métabolites oxydés sont souvent inférieures à la limite de détection.

Des modèles toxicocinétiques physiologiques (PBPK) ont été développés pour les phtalates les plus étudiés : le DBP et le DEHP. Keys et ses collaborateurs (1999, 2000) ont tout d'abord développé des modèles PBPK pour évaluer le rôle de différents processus de transport dans la clairance du MBP et du MEHP chez le rat mâle adulte. Ces modèles, basés sur les concentrations sanguines après administration orale ou intraveineuse des composés parents ou des monoesters, décrivent précisément la cinétique de répartition entre le compartiment sanguin et les différents tissus. Plus récemment, un modèle PBPK a été proposé pour déterminer l'exposition des tissus cibles au DBP et ses métabolites libre et conjugué chez des rates en gestation, prenant en compte l'exposition du fœtus (Clewell et coll., 2008). Ce modèle décrit la clairance urinaire, plasmatique, biliaire et fécale du DBP, du MBP, ainsi que des métabolites oxydés libres et conjugués après des administrations unique (intraveineuse et orale) ou répétée (orale) de DBP à des doses de 50, 100 ou 500 mg/kg pc. Le modèle permet de déterminer l'exposition fœtale au MBP, le métabolite actif, à partir de données telles que la dose externe, les concentrations plasmatiques ou urinaires chez la mère, ou encore les teneurs mesurées dans le liquide amniotique. Ce modèle a également été extrapolé à l'homme en ajustant les paramètres physiologiques et en utilisant des approches allométriques pour estimer les changements d'échelle concernant la distribution des xénobiotiques (Campbell et coll., 2008). Il permet, à partir des concentrations urinaires en MBP, de prédire l'exposition quotidienne en DBP, ce qui suggère que le métabolisme du DBP à faible dose chez le rat et chez l'homme présente peu de différences.

En conclusion, l'exposition de l'homme adulte au DEHP est estimée en moyenne à environ 2 µg/kg pc/j d'après les données de concentrations urinaires de ces phtalates ou des métabolites, recueillies dans les populations occidentales. Elle est légèrement plus faible pour les autres phtalates. On observe peu de différences entre les hommes et les femmes. Comparés dans le même temps aux adultes, tous les enfants (0-3 ans) présentent des concentrations 3 à 5 fois plus élevées. D'après des données allemandes, 1,5 % des enfants en Allemagne présentent une exposition au DEHP supérieure au niveau d'exposition pour lequel l'absence d'effet adverse n'est pas certaine. En

2010, la *Consumer Product Safety Commission* américaine (CPSC) déterminait une DJT de 5,8 µg/kg pc/j pour le DEHP.

L'exposition des nourrissons et des jeunes enfants aux phtalates provient essentiellement de la voie alimentaire. Sur la base des teneurs en DEHP dans les aliments pour bébés, les auteurs ont estimé que l'exposition des nourrissons de moins de 6 mois aux phtalates pouvait atteindre 10 µg/kg pc/j et près de 20 µg/kg pc/j chez les enfants de plus de 6 mois.

Depuis les interdictions et restriction d'usage, d'autres phtalates que le DEHP (notamment le DINP) sont plus souvent retrouvés en particulier chez les enfants. Par ailleurs, lors des hospitalisations, les dispositifs médicaux constituent des sources importantes d'exposition aux phtalates chez les enfants (prématurés…) et les adultes (dialysés).

Les phtalates sont très bien absorbés par la voie digestive, par inhalation et probablement par la voie cutanée et ne sont pas retenus dans l'organisme. Si on n'observe pas de bioaccumulation, il est tout de même important de signaler que l'exposition est continue en relation avec la diversité des sources de contamination (alimentaire, environnement, cosmétiques…). L'exposition chez l'homme peut être appréciée par la mesure de biomarqueurs dans les liquides biologiques. Des phtalates et leurs métabolites sont détectés dans le sang du cordon et dans le liquide amniotique à des concentrations néanmoins plus faibles que celles mesurées dans l'urine des mères prélevée au moment de l'accouchement.

Le métabolisme des phtalates est complexe et résulte parfois en la production de plusieurs métabolites. Les études chez l'animal montrent que le DEHP subit une hydrolyse enzymatique en mono(éthylhexyl) phtalate (MEHP), son métabolite principal et en métabolites oxydés. L'activité hydrolytique est assurée par des enzymes pancréatiques (lipases) et plasmatiques (estérases). Les lipases (foie, reins, intestin) sont plus actives chez les rongeurs que chez les primates. Des études récentes semblent indiquer que chez l'homme, les principaux métabolites dans les urines sont les métabolites oxydés. La mesure des métabolites oxydés dans les liquides biologiques permet de contourner les possibles contaminations liées au processus analytique de mesure.

Les différences de sensibilité aux effets des phtalates observées entre différentes espèces (rongeurs, primates non humains et humains) pourraient être associées aux différences dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. La concentration maximum sanguine en MEHP est 7,5 fois plus faible chez le primate non humain (marmouset) que chez le rat. Chez l'homme et le primate non humain, le MEHP est présent dans le sang et l'urine essentiellement comme glucuro-conjugué. Cependant, des métabolites de DEHP, avec des chaînes ester carboxylées, sont retrouvés sous formes conjuguées et libres dans les échantillons urinaires humains. Différents tissus peuvent être la cible de ses métabolites (testicule, ovaire…). Il apparaît important d'analyser les effets qui pourraient être associés aux métabolites oxydés et non oxydés.

Bibliographie

ALBRO PW Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environ Health Perspect* 1986, **65** : 293-298

ASO S, EHARA H, MIYATA K, HOSYUYAMA S, SHIRAISHI K, et coll. A two generation reproductive toxicity study of butyl benzyl phthalate in rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 2005, **30** : 39-58

ATSDR. Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). 2002. (http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf)

BECKER K, GUEN T, SEIWERT M, CONRAD A, PICK-FUSS H, et coll. GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009,**212** : 685-692

CALAFAT AM, NEEDHAM LL, SILVA MJ, LAMBERT G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004, **113** : e429-e434

CLEWELL RA, KREMER JJ, WILLIAMS CC, CAMPBELL JL JR, ANDERSEN ME, BORGHOFF SJ. Tissue exposures to free and glucuronidated monobutylyphthalate in the pregnant and fetal rat following exposure to di-n-butylphthalate: evaluation with a PBPK model. *Toxicol Sci* 2008 **103** : 241-259

CAMPBELLJL JR, CLEWELL RA, TAN Y, CLEWELL HJ III. Interpreting biomonitoring data for monobutyl phthalate in urine using a physiologically based pharmacokinetic model: estimation of in utero exposure. *Epidemiology* 2008, **19** : S248

CONSUMER PRODUCT SAFETY COMMISSION (CPSC). Overview of dialkyl ortho-phthalates toxicity. 2010 (http://www.cpsc.gov/about/cpsia/phthalover.pdf)

DANIEL JW, BRATT H. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* 1974, **2** : 51-65

DAVID RM, MOORE MR, FINNEYDC, GUEST D. Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000, **55** : 433-443

EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (ECB). 1,2-benzenedicarboxylic acid, di-C8-10-branched alkyl esters, C9-rich and di-isononyl phthalate (DINP). CAS nos : 68515-48-0 and 28553-12-0, EINECS nos : 271-090-9 and 249-079-5. Summary risk assessment report, 2003 (http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/existing-chemicals/risk_assessment/summary/dinpsum046.pdf)

EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (ECB). Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). CAS no: 117-81-7. EINECS no : 204-211-0. Summary risk assessment report, 2008 (http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/existing-chemicals/risk_assessment/summary/dehpsum042.pdf)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA J* 2005a, **243** : 1-20(http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/243.pdf)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and material in contact with food (AFC) on a

request from the Commission related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. Question No. EFSA-Q-2003-192, adopted on June 23, 2005. *EFSA J* 2005b, **242** : 1-17 (http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/242.pdf)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments [AFC] concernant le phtalate de di-isodécyle (DIDP) utilisé dans les matériaux en contact avec les aliments. *EFSA J* 2005c, **245** : 1-14 (http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/245.pdf)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Butylbenzylphthalate (BBP) for use in food contact materials. *EFSA J* 2005d, **241** : 1-14 (http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/241.pdf)

EL SISI AE, CARTER DE, SIPES IG. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1989, **12** : 70-77

EXXON BIOMEDICAL SCIENCES. Chronic Toxicity/Oncogenicity Study in F-344 Rats. Test Material: MRD-83-260. Project No 326075 performed at Exxon Biomedical Sciences, Inc., Unpublished Laboratory Report, January 13, 1986

FREDERIKSEN H, SKAKKEBAEK NE, ANDERSSON AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007, **51** : 899-911

HAZLETON LABORATORIES. 13-Week Dietary Administration - Dogs Plasticiser (DIDP) submitted to WR Grace and Company. 1968

HINES CJ, NILSEN HOPF NB, DEDDENS JA, CALAFAT AM, SILVA MJ, et coll. Urinary phthalate metabolite concentrations among workers in selected industries: a pilot biomonitoring study. *Ann Occup Hyg* 2009, **53** : 1-17

HÖGBERG J, HANBERG A, BERGLUND M, SKERFVING S, REMBERGER M, et coll. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 334-339

ITO Y, YOKOTA H, WANG R, YAMANOSHITA O, ICHIHARA G, et coll. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol* 2005, **79** : 147-154

KATO K, SILVA MJ, WOLF C, GRAY LE, NEEDHAMLL, CALAFAT AM. Urinary metabolites of diisodecyl phthalate in rats. *Toxicology* 2007, **236** : 114-122

KAVLOCK R, BOEKELHEIDE K, CHAPIN R, CUNNINGHAM M, FAUSTMAN E, et coll. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002a, **16** : 529-653

KAVLOCK R, BOEKELHEIDE K, CHAPIN R, CUNNINGHAM M, FAUSTMAN E, et coll. NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002b, **16** : 453-487

KAVLOCK R, BOEKELHEIDE K, CHAPIN R, CUNNINGHAM M, FAUSTMAN E, et coll. NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel

report on the reproductive and developmental toxicity of di-isodecyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002c, **16** : 655-678

KEYS DA, WALLACE DG, KEPLER TB, CONOLLY RB. Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood and testes disposition of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci* 1999, **49** : 172-185

KEYS DA, WALLACE DG, KEPLER TB, CONOLLY RB. Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood disposition of di(n-butyl) phthalate and mono(n-butyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000, **53** : 173-184

KOCH HM, ANGERER J. Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *Int J Hyg Environ Health* 2007, **210** : 9-19

KOCH HM, ROSSBACH B, DREXLER H, ANGERER J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates-determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res* 2003, **93** : 177-185

KOCH HM, BOLT HM, ANGERER J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2004, **78** : 123-130

KOCH HM, BOLT HM, PREUSS R, ECKSTEIN R, WEISBACH V, ANGERER J. Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol* 2005, **79** : 689-693

LATINI G, DE FELICE C, PRESTA G, DEL VECCHIO A, PARIS I, RUGGIERI F, MAZZEO P. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1783-1785

LATINI G, WITTASSEK M, DEL VECCHIO A, PRESTA G, DE FELICE C, ANGERER J. Lactational exposure to phthalates in Southern Italy. *Environ Int* 2009, **35** : 236-239

LEE KY, SHIBUTANI M, TAKAGI H, KATO N, TAKIGAMI S, et coll. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 2004, **203** : 221-238

LINGTON AW, BIRD MG, PLUTNICK RT, STUBBLEFIELD WA, SCALA RA. Chronic toxicity and carcinogenic evaluation of diisononyl phthalate in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1997, **36** : 79-89

MAHOOD IK, SCOTT HM, BROWN R, HALLMARK N, WALKER M, SHARPERM. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 55-61

MAIN KM, MORTENSEN GK, KALEVA MM, BOISEN KA, DAMGAARD IN, et coll. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006, **114** : 270-276

MÜLLER AK, NIELSEN E, LADEFOGED O. Report : Human Exposure to Selected Phthalates in Denmark by the Danish Veterinary and Food Administration. 2003 (http://www.food.dtu.dk/De(ault.aspx?=ID22630)

MCKEE RH, EL-HAWARI M, STOLTZ M, PALLAS F, LINGTON AW. Absorption, disposition and metabolism of di-isononyl phthalate (DINP) in F-344 rats. *J Appl Toxicol* 2002, **22** : 293-302

MORTENSEN GK, MAIN KM, ANDERSSON AM, LEFFERS H, SKAKKEBAEK NE. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem* 2005, **382** : 1084-1092

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Committee on the Health Risks of Phthalates. Phthalates and Cumulative Risk Assessment: The Task Ahead. National Academies Press, Washington, DC, 2008

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Benzyl Butyl Phthalate Feed Studies. 1997

PETERSEN JH, BREINDAHL T. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam* 2000, **17** : 133-141

SILVA MJ, MALEK NA, HODGE CC, REIDY JA, KATO K, et coll. Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, **789** : 393-404

SILVA MJ, REIDY JA, KATO K, PREAU JL JR, NEEDHAMLL, CALAFAT AM. Assessment of human exposure to di-isodecyl phthalate using oxidative metabolites as biomarkers. *Biomarkers* 2007, **12** : 133-144

SRIVASTAVA S, AWASTHI VK, SRIVASTAVA SP, SETH PK. Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Indian J Exp Biol* 1989, **27** : 885-888

STROHEKER T, REGNIER JF, LASSURGUERE J, CHAGNON MC. Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006, **44** : 2064-2069

SUZUKI Y, NIWA M, YOSHINAGA J, WATANABE C, MIZUMOTO Y, et coll. Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environ Health Prev Med* 2009, **14** : 180-187

TANAKA A, ADACHI T, TAKAHASHI T, YAMAHA T. Biochemical studies on phthalic esters I. Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* 1975, **4** : 253-264

TYL RW, MYERS CB, MARR MC. Two-generation reproductive toxicity evaluation of Butyl Benzyl Phthalate administered in the feed to CD (Sprague-Dawley) rats. RTI Project No. 65C-0726-200, RTI Protocol No. RTI-761. 2001

TYL RW, MYERS CB, MARR MC. Reproductive toxicity evaluation of Butyl Benzyl Phthalate in rats. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 241-264

VANDENTORREN S, ZEMAN F, MORIN L, SARTER H, BIDONDO ML, et coll. Bisphenol A and phtalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study : implications for large scale biomonitoring and studies *Environ Res* 2011 (sous presse)

WESTER RC, MELENDRES J, SEDIK L, MAIBACH H, RIVIERE JE. Percutaneous absorption of salicylic acid, theophylline, 2, 4-dimethylamine, diethyl hexyl phthalic acid, and p-aminobenzoic acid in the isolated perfused porcine skin flap compared to man in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **151** : 159-165

WILLIAMS DT, BLANCHFIELD BJ. The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14 C in the rat. *J Agric Food Chem* 1975, **23** : 854-858

WITTASSEK M, ANGERER J. Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl* 2008, **31** : 131-138

WITTASSEK M, WIESMÜLLERGA, KOCH HM, ECKARD R, DOBLER L, et coll. Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* 2007a, **210** : 319-333

WITTASSEK M, HEGER W, KOCH HM, BECKER K, ANGERER J, KOLOSSA-GEHRING M. Daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 2007b, **210** : 35-42

WITTASSEK M, ANGERER J, KOLOSSA-GEHRING M, SCHÄFER SD, KLOCKENBUSCH W, et coll. Fetal exposure to phthalates--a pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 2009, **212** : 492-498

WOLFE GW, LAYTONKA. Multigeneration reproduction toxicity study in rats: multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TRC Study No. 7244-200. 2003.TherImmune Research Corporation, Gaithersbury, Maryland

WORMUTH M, SCHERINGER M, VOLLENWEIDER M, HUNGERBÜHLER K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal* 2006, **26** : 803-824

34
Études épidémiologiques

Au cours des dix dernières années, quelques études épidémiologiques ont été réalisées pour documenter l'impact sanitaire potentiel de l'exposition aux phtalates dans l'espèce humaine, notamment pour apprécier les conséquences d'une exposition sur la fonction de reproduction chez l'homme et la femme. Ce chapitre envisage d'abord les effets des expositions *in utero* et à la naissance puis des expositions postnatales.

Études chez le nouveau-né et l'enfant

Quatre études sont rapportées concernant la recherche d'effets après exposition *in utero* et néonatale aux phtalates.

Cryptorchidie, fonction leydigienne

Main et coll. (2006) ont étudié la teneur en phtalates du lait maternel dans un groupe de 62 nouveau-nés présentant une cryptorchidie et 68 nouveau-nés témoins dans le cadre d'une étude binationale (Finlande et Danemark) (tableau 34.I). Après standardisation des modalités de l'examen clinique, les nouveau-nés sont examinés à la naissance et au troisième mois. Six métabolites de phtalates ont été dosés dans le lait maternel, MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP, MINP, correspondant respectivement aux phtalates parents suivants : DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DINP. À l'exception du MMP, tous ces phtalates ont été détectés dans le lait maternel. Par ailleurs, un dosage de FSH, LH, SHBG, testostérone, inhibine, a été effectué chez les nouveau-nés à 3 mois. L'index de testostérone libre a été apprécié par le rapport testostérone x 100/SHBG. Cette étude ne met pas en évidence d'association significative entre les phtalates contenus dans le lait maternel et la présence ou l'absence de cryptorchidie. En revanche, une association est retrouvée avec certains indicateurs de la fonction leydigienne : le ratio LH/index de testostérone libre est significativement augmenté avec les concentrations de MMP, MEP et MBP. Le MBP est corrélé négativement avec l'index de testostérone libre et MINP est corrélé positivement avec la LH. Le MEP et le MBP sont également positivement corrélés avec le taux de SHBG. Les auteurs concluent que la fonction leydigienne semble atteinte lors de l'exposition pré- et périnatale aux phtalates.

Tableau 34.I : Effets des phtalates au cours d'une exposition *in utero* ou périnatale sur l'appareil de reproduction

Référence Type d'étude Pays	Population/Dosage métabolites	Métabolites recherchés	Résultats
Main et coll., 2006 Cas-témoins Finlande et Danemark	62 nouveau-nés avec cryptochordie 68 nouveau-nés témoins (lait maternel)	MMP, MEP, MBP, MBzP MEHP MINP	Pas d'association avec cryptorchidie Ratio LH/index de testostérone libre ↑ (MMP, MEP et MBP ↑) LH↑ (MINP↑) SHBG↑ (MEP, MBP↑) Testostérone libre↓ (MBP↑
Swan et coll., 2008 Transversale États-Unis	106 nouveau-nés mâles (urine maternelle 28,6 semaines d'aménorrhée)	MEP, MBP MEHP, MEHHP, MEOHP	Distance anogénitale ↓ (MEHP, MEHHP, MEOHP, MEP et MBP ↑) Trouble de la descente testiculaire et largeur du pénis (MEHP)
Huang et coll., 2009 Transversale Taïwan	65 mères Urines et fluide de l'amniocentèse (16-20 semaines de gestation) 64 nouveau-nés (31 filles, 33 garçons)	MBP, MEHP, MEP, MBzP, MMP	Distance anogénitale plus courte chez les filles (MBP et MEHP dans le fluide amniotique)
Ormond et coll., 2009 Cas-témoins Angleterre	471 enfants avec hypospadias 490 témoins	Pas de dosages Matrice emploi-exposition	Hypospadias Corrélation exposition phtalates (exposés *vs* non exposés : OR=3,12 ; IC 95 % [1,04-11,46])

Effet sur la distance anogénitale

Le groupe de Swan (Swan et coll., 2008) étudie les liens entre exposition prénatale aux phtalates et la distance anogénitale chez 106 nourrissons mâles examinés entre 2 et 36 mois lors de la première visite postnatale (moyenne : 12,8 mois). Les dosages de métabolites MEP, MBP MEHP, MEHHP et MEOHP (correspondant respectivement aux phtalates parents suivants : DEP, DBP et DEHP pour les trois derniers) sont effectués dans les urines à 28,6 semaines d'aménorrhée en moyenne. Les concentrations des métabolites sont distribuées en quartiles et un score total prenant en compte tous les phtalates est calculé (score de 0 à 15). Les seins, testicules, pénis sont examinés chez le nouveau-né ainsi que la distance anogénitale. Les concentrations urinaires (MEP, MBP, MEHP, MEHHP, MEOHP) sont inversement corrélées avec la distance anogénitale. Les concentrations urinaires moyennes des métabolites du DEHP (MEHP, MEHHP, MEOHP) et de MEP sont supérieures dans le groupe avec une distance anogénitale plus courte.

Dans le groupe des nouveau-nés ayant une distance anogénitale courte, il n'y a pas de mère avec un score total de phtalates bas alors qu'il n'y a qu'une mère avec score total haut dans le groupe avec distance anogénitale longue

(p<0,001). Par ailleurs, la concentration de MEHP est en relation avec un trouble de la descente testiculaire (testicule non descendu ou rétractile) et la largeur du pénis est inversement corrélée avec la concentration du MEHP et avec la somme des métabolites du DEHP.

L'équipe de Huang (Huang et coll., 2009) s'intéresse également à l'exposition prénatale aux phtalates et aux résultats de l'examen du nouveau-né. Pour apprécier l'exposition prénatale, des dosages des métabolites MMP, MEP, MBP, MEHP, MBzP (correspondant aux phtalates parents suivants : DMP, DEP, DBP, DEHP, BBP) sont effectués au moment de l'amniocentèse dans les urines et le fluide amniotique (16-20 semaines de gestation) chez 65 mères retenues pour l'étude car présentant une amniocentèse normale. Soixante-quatre nouveau-nés sont suivis (31 filles, 33 garçons). Les MBP et MEHP sont détectés respectivement dans 100 % (médiane 85,5 µg/l et 81,3 µg/l pour les filles et les garçons) et dans plus de 90 % (médiane 24 µg/l et 22,1 µg/l pour les filles et les garçons) des échantillons de liquide amniotique. Les autres métabolites sont à l'état de traces dans le fluide de l'amniocentèse. Dans les urines, le taux de détection est de 100 % pour le MBP, 98 % pour le MEHP, 96 % pour le MEP, 86 % pour le MMP, et 63 % pour le MBzP. Ainsi, cette étude confirme l'exposition de la mère et probablement du fœtus durant la grossesse.

L'examen des nouveau-nés met en évidence une distance anogénitale plus courte dans le groupe à haute concentration de MBP dans le fluide amniotique comparé au groupe à concentration plus basse (groupes dichotomisés en fonction de la médiane de MBP) chez les nouveau-nés filles (13,9 *versus* 17,6 mm, p=0,024). Le même profil est retrouvé pour le MEHP amniotique. L'index de distance anogénitale en fonction du poids ou de la taille est également plus court dans le groupe à haute concentration en MBP chez les filles. À l'inverse, chez les garçons, cette différence n'est pas observée. Les auteurs suggèrent une plus grande sensibilité des fœtus féminins à un effet anti-androgène des phtalates pour expliquer la différence d'effet retrouvée en fonction du sexe. Il faut noter malgré les résultats intéressants l'effectif réduit de cette étude (31 filles, 33 garçons).

Si de nombreuses questions restent posées (par exemple comment expliquer les différences en fonction du sexe dans l'étude de Huang), les résultats de l'étude de Swan, qui présente l'effectif le plus important de garçons éxaminés, suggère de par le raccourcissement de la distance anogénitale, une action des phtalates sur l'androgénisation du fœtus. D'autres études sur des effectifs plus larges sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats.

Hypospadias

Ormond et coll. (2009) ont analysé le risque d'hypospadias chez les enfants dont la mère a été exposée professionnellement pendant la grossesse à des perturbateurs endocriniens. Dans cette étude cas-témoins, 471 enfants souffrant d'hypospadias nécessitant un acte chirurgical, et 490 enfants témoins

nés dans la même région et à la même époque, ont été sélectionnés. Les mères ont été interrogées par téléphone d'après un questionnaire standard permettant entre autres d'apprécier l'occupation professionnelle des mères et l'exposition domestique et environnementale aux agents chimiques. L'analyse fait ressortir un lien avec l'exposition aux produits capillaires (exposés *versus* non exposés : OR=2,4 ; IC 95 % [1,4-4,2]). Une matrice emploi-exposition a été utilisée pour caractériser l'exposition professionnelle aux phtalates et a rapporté une prévalence de cette exposition inférieure à 5 %. Un risque augmenté d'hypospadias associé à l'exposition professionnelle aux phtalates (exposés *versus* non exposés : OR=3,1 ; IC 95 % [1,0-11,5]) a ainsi été estimé en s'appuyant sur des effectifs limités (14 cas et 4 témoins exposés).

Autres effets sur différents paramètres de développement chez le nouveau-né

Étudiant des effets d'une possible exposition aux phtalates sur le développement, Wolff et coll. (2008), dans une étude transversale, ont recherché 10 métabolites de phtalates et également 5 phénols dans les urines de respectivement 382 et 367 femmes enceintes. Un quart des prélèvements ont été collectés entre 25 et 30 semaines d'aménorrhée, 45 % entre 31 et 35 semaines, et 30 % entre 36 et 40 semaines d'aménorrhée. Après analyse intégrant de nombreux paramètres, les métabolites de bas poids moléculaire des phtalates sont associés positivement avec l'âge gestationnel et avec la circonférence crânienne, l'effet étant cependant modéré.

Latini et coll. (2003) ont étudié les concentrations de DEHP et de son métabolite MEHP dans le sang du cordon de 84 nouveau-nés à la maternité de Brindisi. Un ou les deux phtalates étaient présents dans 88,1 % des échantillons avec des concentrations moyennes de 1,19±1,15 mg/l pour le DEHP et 0,52±0,61 mg/l pour le MEHP. Les nouveau-nés avec un sang du cordon présentant du MEHP ont eu une durée de gestation plus courte que lorsque le MEHP n'était pas détecté dans le sang (38,2±2,3 *versus* 34,9±1,4 semaines d'aménorrhée). Les auteurs émettent l'hypothèse que les phtalates pourraient induire une inflammation utérine qui est un facteur de risque connu de prématurité.

Zhang et coll. (2009), à Shangaï, s'intéressent aux relations entre phtalates et poids de naissance. Ainsi, les cas représentent 88 nouveau-nés à faible poids de naissance (âge gestationnel ≥37 semaines, poids <2 500 g) 113 nouveau-nés à poids normal (≥2 500 g et âge gestationnel ≥37 semaines) constituant le groupe témoin. Des prélèvements de sang du cordon, du méconium et du sang maternel sont effectués. Trois phtalates communs (DEP, DBP et DEHP) et deux de leurs métabolites (MBP et MEHP) sont recherchés dans le sang du cordon et le méconium ainsi que dans le sang maternel. Plus de 70 % des échantillons ont des niveaux quantifiables de phtalates. Seuls le MBP et le MEHP sont détectés dans le méconium. Le groupe des nouveau-nés de petits

poids a de plus hautes concentrations de DBP et MEHP dans le sang du cordon comparé au groupe à poids normal (respectivement médianes de 1,8 mg/l *versus* 2,7 mg/l, p<0,01 et 1,1 mg/l *versus* 2,5 mg/l, p<0,001). Dans le méconium, les valeurs de MBP et MEHP sont deux fois plus élevées dans le groupe de petit poids comparé au groupe témoin (p<0,005). Après prise en compte des possibles variables de confusion, les auteurs suggèrent que l'exposition au DBP *in utero* (sang cordon, méconium) est associée avec un plus faible poids de naissance et l'exposition au DEHP avec une taille plus petite. Le fait d'être dans le 4e quartile pour le DBP et le MEHP dans le sang du cordon augmente le risque d'avoir un poids de naissance inférieur à 2 500 g (respectivement OR=3,54, [1,54-6,15], p=0,008 ; OR=2,05, [1,17-3,70], p=0,05). Dans le méconium, ce risque est également augmenté pour le MBP (OR=4,66 ; [2,14-6,85] ; p<0,001) et le MEHP (OR=3,23 ; [1,31-5,94] ; p=0,04). Les auteurs concluent que l'exposition à ces phtalates est associée, avec un effet dose, à un plus bas poids de naissance chez le nouveau-né.

Études chez les adolescents

Dans une étude cas-témoins, Durmaz et coll. (2010) ont analysé le taux plasmatique de DEHP et MEHP chez 39 adolescents atteints de gynécomastie et 20 sujets témoins ne souffrant d'aucun désordre hormonal. Le DEHP était détecté dans tous les échantillons et son métabolite MEHP également, sauf dans un échantillon témoin. Il existe une corrélation positive avec les taux plasmatiques de DEHP et MEHP ; ces taux sont significativement plus élevés chez les adolescents souffrant de gynécomastie (DEHP : 4,66±1,58 *versus* 3,09±0,90 mg/l, respectivement cas et témoins (OR=2,77 ; IC 95 % [1,48–5,21]) ; MEHP : 3,19±1,41 *versus* 1,37±0,36 mg/l (OR=24,76 ; IC 95 % [3,5–172,6])). Il n'existe aucune corrélation avec les taux d'hormones (FSH, LH, SHBG, testostérone totale et libre). Cette étude réalisée sur un petit nombre de sujets est la première recherchant les liens entre phtalates et gynécomastie chez l'adolescent. Elle doit être confortée par des travaux sur des effectifs plus importants avec notamment l'analyse des rapports hormonaux souvent étudiés dans la gynécomastie.

Études chez l'homme adulte

Effet sur les paramètres du sperme

Plusieurs études ont recherché les relations entre exposition aux phtalates et appareil de reproduction chez l'homme adulte (tableau 34.II). Le protocole de ces études était différent (études transversales, études cas-témoins, études

exposés/non exposés) ainsi que les indicateurs étudiés (paramètre du sperme, ADN du spermatozoïde, hormones).

Rozati et coll. (2002) en Inde, rapportent les concentrations séminales de polychlorobyphényles (PCB) et de phtalates dans un groupe de 21 hommes inféconds (cas) ayant une altération d'un ou plusieurs paramètres du sperme mais en l'absence de toute cause ou de pathologie identifiée. Les résultats sont comparés à ceux du groupe témoin composé de 32 hommes féconds (témoins) ayant un spermogramme normal, n'ayant pas d'antécédent d'exposition à un facteur de risque ni de maladie. Les PCB sont détectés dans le plasma séminal des hommes inféconds (moyenne 7,63±5,35 mg/l) mais pas dans celui des hommes féconds. Les concentrations séminales de PCB sont négativement corrélées avec le volume de l'éjaculat, la mobilité progressive des spermatozoïdes, la vitalité, mais corrélées positivement avec la présence d'ADN simple brin témoignant de l'altération de l'ADN du gamète.

Les concentrations séminales de phtalates sont significativement augmentées dans le groupe des hommes inféconds comparé au groupe des hommes féconds (2,03±0,21 *versus* 0,06±0,02). Les concentrations de phtalates sont corrélées négativement avec le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux (r=-0,77, p<0,01) et positivement avec l'altération de l'ADN du gamète (r=0,85, p<0,01). Les concentrations de PCB et de phtalates sont plus élevées chez les inféconds urbains consommant du poisson que chez les inféconds ruraux consommateurs de poisson, suivi des inféconds urbains végétariens et des inféconds ruraux végétariens témoignant probablement de l'influence du mode de vie et de l'alimentation sur les concentrations séminales de PCB et de phtalates.

L'étude de Zhang (Zhang et coll., 2006), à Shangaï, a également rapporté les concentrations de phtalates dans le plasma séminal. Dans cette étude transversale, 52 hommes consultant l'Institut of « *Planned Parenthood Research* » sont inclus sans que soient précisées les caractéristiques de ces hommes. Chez 37 hommes, les phtalates sont détectés dans le sperme avec des concentrations moyennes de 0,47 mg/l (mini-maxi : 0,13-1,32) pour le DEP, 0,16 mg/l (0,09-0,57) pour le DBP et 0,28 mg/l (0,08-0,98) pour le DEHP. Les auteurs rapportent une corrélation positive entre le temps de liquéfaction du sperme et les concentrations séminales des trois phtalates (coefficients de corrélations de l'ordre de 0,45 ; p<0,01). A l'inverse, une corrélation négative est retrouvée entre le volume du sperme et la concentration séminale en DBP (-0,38, p<0,05) et le DEHP (-0,37, p<0,05). Enfin, une corrélation positive entre la concentration séminale de DEHP et le nombre de spermatozoïdes morphologiquement anormaux est rapportée (+0,36, p<0,05). Par ailleurs, les auteurs suggèrent un lien entre la concentration de phtalates et la vitalité des spermatozoïdes. Cette étude montre la présence de phtalates dans le plasma séminal de la majorité des hommes étudiés mais le manque de précision concernant le recrutement de ces hommes, les méthodes d'analyse du sperme ainsi que la présentation des résultats rendent l'interprétation des résultats difficile même

si une relation avec le temps de liquéfaction du sperme et le volume de l'éjaculat pourrait éventuellement suggérer une action des phtalates sur les glandes du tractus génital masculin.

Le groupe de Russ Hauser, de l'école de santé publique à Harvard, Boston, a publié de nombreux articles sur les paramètres du sperme et les phtalates (Duty et coll., 2003a et b ; Hauser et coll., 2006 ; Hauser et coll., 2007 ; Hauser et coll., 2008). Les dosages des phtalates ont été effectués dans les urines d'hommes réalisant une exploration de sperme dans un laboratoire d'andrologie en raison d'une infécondité de couple. L'étude de 2006 (Hauser et coll., 2006) étendant les études antérieures, présente un effectif de 463 hommes recrutés entre janvier 2000 et mai 2004. Utilisant l'HPLC à haute performance et la spectrométrie de masse en tandem, le MEP (métabolite du DEP) est détecté dans 100 % des échantillons, les MBP, MBzP, MEHHP, MEOHP (métabolites du DBP, BBP et DEHP respectivement) dans environ 95 % des échantillons, le MEHP et le MMP (métabolite du DEHP et DMP respectivement) dans respectivement 83 et 76 % des échantillons d'urines. Le groupe d'hommes ayant des paramètres du sperme normaux sert de groupe de comparaison. Les auteurs excluent les patients présentant une azoospermie ou les patients diabétiques et tiennent compte de l'âge, du délai d'abstinence et de la consommation tabagique dans leurs analyses. Ils retrouvent une relation entre la concentration de MBP dans les urines (découpage en quartiles) et la concentration ainsi que la mobilité des spermatozoïdes. L'augmentation de la concentration de MBP augmente le risque d'avoir une concentration anormale (OR par quartile de MBP : 1,1, 3,1, 2,5, 3,3 ; p=0,04 pour la tendance) ou une mobilité anormale (OR par quartile de MBP : 1,0, 1,5, 1,5, 1,8 ; p=0,04 pour la tendance). Une évolution similaire pour le MBzP est suggérée avec la concentration de spermatozoïdes (OR par quartile de MBzP : 1,0, 1,1, 1,1, 1,9 ; p=0,13 pour la tendance). Ces résultats confirment ceux qui avaient été présentés dans les précédentes études de ce groupe.

Récemment, Russ Hauser (Hauser et coll., 2008), analysant de nouveau leur travail antérieur souligne l'intérêt du rapport MEHP/MEHP+MEOHP +MEHHP, qui serait un meilleur indicateur de la toxicité des phtalates car étant également un reflet de la détoxication. Ainsi une analyse intégrant ces paramètres apparaît souhaitable sur une large population. Par ailleurs, la question de doser d'autres substances exogènes apparaît également licite dans la mesure où des actions synergiques (en moins ou en plus) pourraient être mises en jeu.

Ce même groupe (Duty et coll., 2003a) a étudié les relations entre la concentration de phtalates urinaires et l'altération de l'ADN des spermatozoïdes appréciées par un test très sensible et utilisé en génotoxicité : le *Comet assay*. Ce test basé sur l'électrophorèse de cellules évalue la fragmentation de l'ADN par observation de la migration des fragments d'ADN réalisant l'image d'une comète d'où son nom. Plusieurs paramètres sont établis à partir de l'image de la comète comme sa densité, sa longueur et plusieurs rapports entre la densité

et la longueur. Après exclusion de 27 sujets ayant des densités urinaires en dehors des valeurs normales, les auteurs recherchent chez 141 hommes recrutés dans le laboratoire d'andrologie, les liens entre concentration de phtalates ou métabolites urinaires (MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP) et les altérations de l'ADN du gamète mâle. L'étendue de la comète (reflet de l'altération de l'ADN) évaluée grâce à un analyseur d'image est significativement associée à la concentration urinaire de MEP : +3,6 µm (IC 95 % : 0,74-6,47) pour chaque augmentation de quartile de MEP. L'intégration des 27 sujets exclus dans la première analyse renforce les résultats. Il n'y a pas de lien entre les autres phtalates étudiés et les résultats du *Comet assay*.

Cette dernière étude est complétée et étendue dans le travail publié en 2007 (Hauser et coll., 2007) portant sur 379 hommes et prenant en compte également l'étude des MEHHP et MEOHP urinaires. La concentration urinaire de MEP est associée à une augmentation de l'altération de l'ADN évaluée par le *Comet assay* comme rapporté dans la première étude. Une augmentation de quartile de la concentration de MEP se traduit par une augmentation de l'étendue de la comète de 6,6 µm (IC 95 % : 0,94-12,3 µm ; p=0,02). Le MEHP est positivement corrélé avec la longueur de la queue de la comète (3,06 µm, IC 95 % [1,33-4,79], p=0,0006). MBP et MBzP sont corrélés positivement avec respectivement le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète et l'étendue de la comète traduisant la fragmentation de l'ADN du gamète. Le MMP est lui inversement corrélé avec les deux derniers paramètres. Les métabolites oxydés du DEHP, soient le MEHHP et le MEOHP, semblent avoir un effet protecteur, leur concentration urinaire étant négativement corrélée à l'altération de l'ADN.

Les auteurs émettent l'hypothèse que les métabolites oxydés du DEHP sont des témoins de son métabolisme et modifient le risque pour l'ADN du spermatozoïde. Le pourcentage de MEHP (égal à [MEHP/MEOHP + MEHHP + MEHP] × 100) traduisant le métabolisme du DEHP présente une relation plus importante avec l'altération de l'ADN du spermatozoïde (par exemple, une augmentation d'un quartile de la concentration de MEHP est associée à une augmentation de 15 µm de l'étendue de la comète (IC 95 %: 7,9-22 µm). Les auteurs soulignent que les relations retrouvées entre concentration urinaire de certains métabolites et les altérations de l'ADN du spermatozoïde le sont pour des concentrations comparables à celles de la population générale.

Une étude réalisée dans la région des grands lacs aux États-Unis chez 45 hommes recrutés dans une clinique d'infertilité (Wirth et coll., 2008), trouve une corrélation significative négative entre MEP urinaire et la concentration de spermatozoïdes (r=-0,37, p=0,01) et le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux (r=-0,38, p=0,01).

Dans le modèle de régression multiple, le fait d'avoir des concentrations urinaires de MEP au-dessus de la médiane augmente le risque d'avoir une concentration de spermatozoïdes basse (OR=6,5 ; IC 95 % [1,0-43,6]). La

concentration de MCPP (3cx-MNOP) est associée au risque d'avoir moins de spermatozoïdes morphologiquement normaux (OR=7,6 ; IC 95 % [1,7-33,3]). Pour le DEHP et le MEP, les risques d'avoir une concentration de spermatozoïdes basse (OR=5,4 ; IC 95 % [0,9-30,8]) et un nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux (OR=3,4 ; IC 95 % [0,9-13,8]) approchent la significativité.

Jönsson et coll. (2005), dans une étude incluant 234 jeunes suédois recrutés au moment de la visite médicale pour le service militaire, âgés de 18 à 21 ans, mesurent les phtalates dans les urines (MEP, MBP, MBzP, MEHP et acide phtalique), les paramètres du sperme, la qualité de la chromatine par le SCSA (*sperm chromatine structure assay*) ainsi que les marqueurs des glandes du tractus génital dans le plasma séminal et des paramètres hormonaux (FSH, LH, testostérone, TEBG, inhibine) sanguins. Un examen andrologique était effectué avec la mesure du volume testiculaire par échographie. Chez ces hommes jeunes, les concentrations urinaires de métabolites des phtalates semblent dans le même ordre de grandeur que celles retrouvées dans les études américaines sauf pour le MEP qui a des valeurs élevées. La détection dans les urines est moins fréquente que dans les échantillons américains, probablement en raison de seuils de détection plus élevés. Les sujets étant dans le 4e quartile pour la concentration de MEP ont un volume testiculaire plus élevé (différence moyenne de 3,2 ml ; 0,4-6,0) mais moins de spermatozoïdes mobiles (-8,8 % ; 0,8-17) et une concentration plasmatique de LH abaissée (-0,7 UI/l ; 0,1-1,2). À l'inverse, un sujet dans le 4e quartile pour la concentration en acide phtalique a un volume testiculaire plus élevé (+3,8 ml ; 0,9-6,8) et plus de spermatozoïdes mobiles (+9,4 % ; 3,7-15). Aucune corrélation n'est retrouvée entre la concentration urinaire de phtalates et la qualité de la chromatine appréciée par le SCSA. Les auteurs concluent que les résultats observés ne permettent pas d'affirmer que l'exposition aux phtalates représente un risque pour la reproduction contrairement aux études réalisées aux États-Unis.

Les résultats de cette étude ne sont pas en accord avec les études du groupe de Hauser, de Wirth, de Rozati et de Zhang, qui retrouvent des relations entre concentration urinaire ou séminale de certains métabolites de phtalates et certains paramètres du sperme. Par ailleurs, cette dernière étude ne retrouve pas de relation entre phtalates et la qualité nucléaire du spermatozoïde (chromatine étudiée par le test SCSA) alors que des relations sont retrouvées dans l'étude de Rozati (test proche du SCSA) ou dans l'étude du groupe de Hauser dans laquelle la fragmentation de l'ADN est mise en évidence (*Comet assay*). Ces différences peuvent s'expliquer par les populations étudiées, les seuils de détection des phtalates, le nombre de phtalates recherchés ainsi que par les méthodes d'analyse des résultats.

Une étude réalisée en Allemagne (Herr et coll., 2009) dans une population de 349 hommes consultant pour infécondité de couple a analysé la concentration urinaire de DEHP et quatre de ses métabolites (MEHP, MEHHP,

MEOHP et MECPP) et leur relation avec la concentration de spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ou de forme normale. Chez la majorité des hommes (236/349), la concentration de spermatozoïdes est supérieure à 20 millions par ml alors que pour la mobilité et le pourcentage de spermatozoïdes normaux la majorité des hommes présente des valeurs abaissées. Il existe une grande variabilité dans les concentrations de phtalates dans les urines avec des valeurs élevées dans le 4e quartile. Le seul résultat significatif témoigne d'une augmentation du risque de présenter une diminution de la concentration de spermatozoïdes entre le 1er et 2e quartile de la concentration urinaire en phtalates. L'absence d'un effet dose (significativité non retrouvée) pour les fortes concentrations en phtalates limite nettement ce résultat. Les auteurs concluent en l'absence de relations entre la concentration urinaire des métabolites des phtalates dosés et les paramètres du sperme étudiés. Ils suggèrent que le type de population d'hommes inféconds avec une cause plurifactorielle de l'infécondité pourrait biaiser les résultats.

L'étude de Won Han (Han et coll., 2009), si elle n'étudie pas les paramètres du sperme, met en évidence, chez 99 hommes jeunes (20-25 ans) en bonne santé, la présence de phtalates et métabolites dans plus de 90 % des plasma séminaux. Les concentrations moyennes sont de 0,61 mg/l pour le DEHP, 1,07 mg/l pour le MEHP, 0,003 mg/l pour le DBP, 0,06 mg/l pour le MBP et 0,39 mg/l pour l'acide phtalique. Cette étude complète les autres travaux analysant les phtalates et métabolites dans le plasma séminal (Rozati et coll., 2002 ; Zhang et coll., 2006) qui retrouvaient un lien entre certains paramètres du sperme et la concentration de phtalates dans le plasma séminal. La mesure des phatalates dans le plasma séminal apparaît une piste intéressante qui mériterait d'être explorée sur de grandes séries en rapportant la concentration des xénobiotiques dans ce compartiment aux caractéristiques du sperme et notamment les caractéristiques nucléaires du gamète mâle.

Tableau 34.II : Études chez l'homme adulte

Référence Type d'étude Pays	Population (milieu étudié)	Métabolites analysés	Paramètres étudiés	Résultats et commentaires
Rozati et coll., 2002 Cas/témoin Inde	21 hommes infertiles avec altération sperme sans étiologie 32 hommes féconds avec sperme normal (plasma séminal)	PE Féconds : 0,06±0,02 µg/ml Infertiles : 2,03±0,21 µg/ml	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie, ADN	Phtalate chez infertiles corrélation – avec morphologie corrélation – anomalies tête corrélation + avec ADN simple brin

Référence Type d'étude Pays	Population (milieu étudié)	Métabolites analysés	Paramètres étudiés	Résultats et commentaires
Duty et coll., 2003a Transversale États-Unis	141 hommes Laboratoire andrologie Exploration infécondité (Urines)	MEP, MMP (100 % des sujets) MEHP, MBP (75 % des sujets) MBzP, MINP, MCHP (95 % des sujets)	ADN des spermatozoïdes : test de la Comète	Interquartile MEP corrélation + avec longueur de la comète
Duty et coll., 2003b Transversale États-Unis	168 hommes Laboratoire andrologie Exploration infécondité Résultats identiques après exclusion Azoospermes et diabétiques (Urines)	MEP (100 % des sujets) MMP, MBP, MBzP (95 % des sujets) MEHP (75 % des sujets)	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie	MBP>médiane : ×2,4 risque d'avoir % mobiles bas Tertile MBzP OR↑ concentration basse (1, 1,4, 5,5 ; p=0,02) Tertile MBP OR↑ concentration basse (1, 1,4, 3,3 p=0,07) Tertile MBP OR↑ mobilité (1, 1,8, 3,0 ; p=0,02) Dose réponse
Duty et coll., 2005 Transversale États-Unis	295 hommes Laboratoire andrologie Exploration infécondité (Urines)	MEP (100 % des sujets) MBP (99 % des sujets) MBzP, MMP, MEHP (95 % des sujets)	Hormones : LH, FSH, inhibine, testostérone, TEBG, testostérone libre	MBzP corrélée négativement à FSH MBP corrélée positivement avec l'inhibine
Jönsson et coll., 2005 Transversale Suède	234 hommes jeunes conscrits service militaire (Urines)	MEP, MBP, MBzP, MEHP, acide phtalique concentration dans le même ordre que population américaine	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie Hormones : FSH, LH, TEBG, testostérone, inhibine	MBP, MBzP, MEHP : pas de relation avec paramètres étudiés Haut quartile MEP ↑ volume des testicules ↓ CASA mobilité ↓ LH Haut quartile acide phtalique → ↑ volume des testicules ↑ % mobiles

Référence Type d'étude Pays	Population (milieu étudié)	Métabolites analysés	Paramètres étudiés	Résultats et commentaires
Zhang et coll., 2006 Transversale Shanghaï	52 hommes *Institute of planned parenthood research* (pas de précision) (Plasma séminal)	DEP, DBP, DEHP (100 % des échantillons) DEP : 0,47 mg/l DBP : 0,16 mg/l DEHP : 0,28 mg/l médiane 0,30 (0,08-1,32) µg/l	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie	Les 3 : corrélation + avec temps liquéfaction DBP, DEHP : corrélation – avec volume
Pan et coll., 2006 Cas/témoin Shanghaï	74 exposés travail plastique 63 non exposés (Urines)	MEHP et MBP : tous les échantillons sauf 1 non exposé Exposés *vs* non exposés MBP : 644,3 *vs* 129,6 µg/g creat MEHP : 567,7 *vs* 5 ,7 µg/g creat	Hormones LH FSH, testostérone libre, E2	Testostérone libre : exposés et non exposés 8,4±1,5 *vs* 9,7±1,4 pg/ml corrélation – total phtalates (r=-0,26, p=0,02) corrélation – MEHP (p<0,01)
Hauser et coll., 2006 Transversale États-Unis	463 hommes Laboratoire andrologie Extension étude de 2003 et 2004 (Urines)	MEP (100 %), MBP (97 %), MBzP (94 %), MMP (76 %), MEHP (83 %), MEHHP et MEOHP (95 %)	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie Groupe référence : hommes avec les 3 paramètres normaux (normes OMS)	MBP ↑ quartile : ↑ OR concentration basse (1, 3,1, 2,5, 3,3) MBP : ↑ OR mobilité basse (1, 1,5, 1,5, 1,8) MBzP (plus haut quartile) :↑ OR concentration basse (1, 1,1, 1,1, 1,9)
Hauser et coll., 2007 Transversale États-Unis	379 hommes Laboratoire andrologie Avril 2000 – mai 2004 (Urines)	MEP (100 %), MBP et MBzP (90 %), MMP et MEHP (75 %), MEHHP et MEOHP (95 %)	ADN des spermatozoïdes : test de la comète	MEP, MBzP, MBP associés à dommage ADN MEP ↑ : ↑ extension comète, MEHP ↑ : ↑ extension comète, % ADN dans queue comète

Référence Type d'étude Pays	Population (milieu étudié)	Métabolites analysés	Paramètres étudiés	Résultats et commentaires
Hauser et coll., 2008 Re-analyse États-Unis	Étude 2006 (sperme) Étude 2007 (ADN spz) (Urines)	% MEHP = 100 × MEHP/(MEHP + MEHHP + MEOHP)	Paramètres du sperme : concentration, mobilité Morphologie ADN des spermatozoïdes : test de la comète	% MEHP chaque quartile : OR 1,0, 1,3, 1,6, 1,5 pour mobilité réduite MEHP associé avec % queue comète (altération ADN) Inverse pour MEHHP et MEOHP : % MEHP meilleur indicateur métabolisme
Wirth et coll., 2008 Transversale États-Unis	45 hommes inféconds sans cause connue d'infertilité (Urines)	MEP, MBP, MiBP, MBzP, MEHP, MEOHP et MEHHP (100 %), MMP (72 %), MCPP (89 %)	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie	MEP corrélation – concentration corrélation – % morphologie normale MEP au-dessus médiane OR : 6,5 (1-43,6) concentration basse MCPP au-dessus médiane OR : 7,6 (1,7-33,3) ; % morphologie normale basse DEHP – concentration limite NS DEP – % morphologie normale limite NS
Herr et coll., 2009 Transversale Allemagne	349 hommes consultants pour infécondité (Urines)	MEHP MEHHP MEOHP MECPP	Paramètres du sperme : concentration, mobilité, morphologie	Pas d'effet significatif

MEP : Monoéthyl phtalate ; MBP : Monobutyl phtalate ; MBzP : Monobenzyl phtalate ; MMP : Monométhyl phtalate ; MEHP : Mono-(2-éthylexyl) phtalate ; MEHHP : Mono-(2-éthyl-5-hydroxyhexyl) phtalate ; MEOHP : Mono-(2-éthyl-5-oxohexyl) phtalate ; CASA : *Computer assisted sperm analysis*

Effets sur les hormones de la reproduction

À Boston, le groupe de Hauser (Duty et coll., 2005) a étudié les hormones de la sphère reproductive (FSH, LH, SHBG, testostérone, inhibine, index d'androgène libre) chez 295 hommes consultant au laboratoire d'andrologie pour infécondité de couple ainsi que les concentrations urinaires de phtalates

(MMP, MBP, MEP, MBzP, MEHP). Ils trouvent une relation négative entre MBzP et FSH et une relation à la limite de la significativité entre MBP et inhibine. La concentration de MBzP passant du 1er quartile au dernier quartile est associée à une diminution de FSH (OR=0,9 ; IC 95 % [0,84-0,96] ; p=0,003). Un changement de quartile pour la concentration de MBP entraîne une augmentation de l'inhibine de 7,33 ng/l (IC 95 % [-0,55-15,21] ; p=0,07).

Cette étude montre des relations entre certains métabolites et les concentrations de FSH et d'inhibine, mais ces relations ne sont pas du tout le reflet d'une action délétère des phtalates sur des hormones témoignant avant tout du bon fonctionnement de la spermatogenèse. Par ailleurs, il faut souligner la particularité de la population étudiée consultant pour infécondité et chez laquelle une proportion d'hommes présente des taux de FSH au-dessus de la limite supérieure de la normale. Enfin, une corrélation négative est retrouvée entre la concentration en MEHP et celle en testostérone (r=-0,17, p<0,005).

Plus intéressante semble l'étude de type exposés/non exposés réalisée en Chine (Pan et coll., 2006). Soixante quatorze hommes exposés au sein d'une usine de PVC au DBP et au DEHP sont comparés à 63 hommes non exposés appariés sur l'âge et la consommation tabagique. Les concentrations urinaires des métabolites MBP (DBP) et MEHP (DEHP) et les concentrations plasmatiques de FSH, LH, testostérone et œstradiol sont déterminées. Le MBP et le MEHP sont détectés chez tous les hommes à l'exception d'un homme non exposé. Les travailleurs exposés ont des taux de MBP et MEHP significativement plus élevés que les non exposés, traduisant ainsi la réalité de l'exposition (respectivement 644,3 *versus* 129,6 µg/g de créatinine pour MBP et 565,7 *versus* 5,7 µg/g de créatinine pour le MEHP). Une corrélation négative entre la concentration en testostérone et la concentration urinaire de MBP (r=-0,24 ; p=0,006) et MEHP (r=-0,24 ; p=0,005) est mise en évidence. Les exposés ont un taux de testostérone significativement plus bas que les non exposés (8,4±1,5 *versus* 9,7±1,4 µg/l, p=0,019). La corrélation négative avec la testostérone est en accord avec celle retrouvée dans l'étude de Duty (Duty et coll., 2005). A l'inverse, l'étude de Jönsson rapportée au-dessus n'a pas mis en évidence de corrélation entre les phtalates urinaires et la testostérone.

Études chez la femme

Une seule étude citée plus haut (Huang et coll., 2009) a cherché à évaluer les conséquences d'une exposition *in utero* aux phtalates sur le développement de l'appareil génital des nouveau-nés de sexe féminin. D'autres études s'intéressant à la fertilité et l'appareil reproducteur de la femme ont évalué les risques de puberté précoce ou d'endométriose en relation avec les concentrations plasmatiques ou urinaires de phtalates ou de leurs métabolites.

Puberté précoce

Parce qu'une forte incidence de thélarche prématuré (développement mammaire avant l'âge de 8 ans sans autre manifestation de puberté) est observée sur l'île de Porto Rico depuis plusieurs décennies, des chercheurs ont comparé un groupe de 41 filles atteintes, d'âge médian 20 mois, à un groupe témoin de 35 filles ayant consulté dans les mêmes hôpitaux pour des soins généraux pédiatriques et d'âge médian de 46 mois (Colón et coll., 2000). À partir de dosages sanguins, ils ont observé des niveaux de phtalates plus élevés dans le groupe des fillettes atteintes que dans le groupe témoin. La validité de cette observation a cependant été très critiquée par d'autres auteurs en raison de contamination possible du matériel utilisé pour réaliser les dosages sanguins (Hauser et Calafat, 2005). D'autres études plus récentes ont ainsi tenté d'examiner l'association entre l'exposition aux phtalates et le risque de puberté précoce chez les filles en utilisant des dosages urinaires de métabolites de phtalates.

Lomenick et coll. (2010) ont recruté 28 filles atteintes de puberté précoce centrale (CPP, défini dans cette étude par un développement mammaire, la présence de poils pubiens entre 2 et 8 ans et des tests hormonaux) et 28 filles sans CPP de même âge et groupe ethnique. L'âge moyen des filles était d'environ 7 ans et 71 % des fillettes étaient d'origine caucasienne. L'étude n'a pas observé de différence de concentration urinaire entre les deux groupes de fillettes pour les 9 métabolites de phtalates analysés (MBP, MEP, MBzP, MCPP, MECPP, MEHHP, MEHP, MEOHP, MIBP). Une étude taïwanaise (Chou et coll., 2009) a dosé 4 métabolites (MMP, MBP, MBzP, MEHP) de phtalates dans les urines de 26 fillettes atteintes de CPP (défini par un développement mammaire avant 8 ans, une croissance osseuse avancée et des tests hormonaux), de 30 fillettes atteintes de thélarche prématuré isolé (développement mammaire uniquement) et de 33 fillettes témoins (sans signe physique de développement pubertaire) recrutées lors d'examens médicaux scolaires. L'âge moyen des fillettes était respectivement de 8,0, 6,7 et 8,2 ans. L'étude n'a montré aucune différence des niveaux urinaires entre le groupe de fillettes CPP et le groupe de fillettes témoins. En revanche, une concentration de MMP plus élevée a été observée chez les fillettes avec un thélarche prématuré en comparaison du groupe témoin. Outre les effectifs modestes et les critères variables de définition de puberté précoce présentés par ces deux études, une autre limite importante est le caractère rétrospectif du prélèvement urinaire recueilli pour mesurer l'exposition potentiellement mise en cause dans l'apparition précoce de signes de puberté.

L'étude de Wolff et coll. (2010) à partir de trois sites d'étude aux États-Unis a examiné le poids, la taille, le développement mammaire et la pilosité pubienne de fillettes âgées de 6 à 9,5 ans ; un prélèvement urinaire a été obtenu pour 1 151 fillettes (93 %) ; différentes informations ethniques, sociodémographiques, médicales et d'exposition ont été obtenues par un questionnaire complété par les parents. Un an après, lors d'une deuxième visite, le

poids, la taille, le développement mammaire (n=985) et la pilosité pubienne (n=967) ont été examinés à nouveau pour la majorité de ces fillettes. Neuf métabolites urinaires de phtalates étaient dosés distinguant les molécules de haut poids moléculaire (MBzP, MCPP, MEHP, MEOHP, MEHHP, MECPP) de celles de faible poids moléculaire (MEP, MBP, MIBP). Comme attendu, les métabolites étaient détectés dans la plupart des échantillons urinaires. Les auteurs ont observé que la somme des concentrations de phtalates de faible poids moléculaire était associée positivement (mais de force faible) avec les stades de développement mammaire et de pilosité pubienne. En revanche, une association négative était observée entre la somme des concentrations de phtalates de haut poids moléculaire et les stades de pilosité pubienne. Les auteurs concluent que les composés qui possèdent une activité hormonale et qui sont retrouvés à des concentrations élevées aujourd'hui, comme les phtalates, peuvent jouer un rôle (même faible) dans le développement pubertaire. Ces composés étant ubiquistes, ce faible rôle pourrait concerner une proportion significative de la population. Les auteurs précisent que le rôle attendu des phtalates sur le développement pubertaire n'était pas évident au vu des effets divergents de ces composés en toxicologie animale. L'effet opposé, suggéré dans cette étude, entre les molécules de phtalates de haut et de faible poids moléculaire sur le développement pubertaire (pilosité pubienne) n'a pas pu être expliqué par les auteurs. Ils notent cependant que les modalités et l'intensité des expositions ambiantes (air, poussières...) diffèrent selon les deux groupes de molécules. Les auteurs ajoutent que la période péripubertaire n'est probablement pas la seule fenêtre d'exposition critique pour le développement pubertaire ; les expositions pendant la grossesse et postnatales pourraient exercer un effet sur le développement de l'enfant. Finalement, les résultats de cette étude doivent être confirmés par d'autres études pour être concluants. Les mécanismes d'action et les périodes critiques d'exposition à ces composés sur le développement pubertaire devront de plus être élucidés.

Endométriose

Trois études évaluant l'impact possible d'une exposition des femmes aux phtalates sur le risque d'endométriose ont été répertoriées (Cobellis et coll., 2003 ; Reddy et coll., 2006 ; Itoh et coll., 2009) (tableau 34.III).

L'étude italienne de Cobellis et coll. (2003) a inclus 35 femmes atteintes de lésions endométriosiques et 24 femmes sans endométriose diagnostiquée. Elles ont été recrutées parmi des femmes consultant pour des problèmes de kystes ovariens ou de douleurs pelviennes régulières, mais sans difficulté *a priori* de reproduction. À partir de dosages sanguins, l'étude a mis en évidence la présence de DEHP et MEHP pour la majorité des femmes. Elle montrait un niveau médian de DEHP plus élevé dans le groupe des femmes atteintes d'endométriose (0,57 mg/l) que dans le groupe des femmes en bonne santé (0,18 mg/l). En revanche, aucune différence des niveaux médians n'a été

observée pour le MEHP, impliquant une absence de corrélation entre les niveaux des deux composés pour cette étude.

L'étude indienne de Reddy et coll. (2006) a inclus 49 femmes infertiles atteintes d'endométriose pelvienne diagnostiquée par cœlioscopie à l'hôpital, ainsi que 38 femmes infertiles et 21 femmes fertiles ayant subi une cœlioscopie pour d'autres problèmes gynécologiques. À partir de dosages sanguins, l'étude a montré des niveaux moyens de DEHP, DNOP, BBP et DBP plus élevés dans le groupe des femmes atteintes d'endométriose (respectivement 2,44, 3,32, 0,66 et 0,44 mg/l) que dans les deux groupes de femmes sans endométriose observant ainsi des niveaux moyens similaires. Une tendance à l'augmentation des niveaux sanguins pour ces composés était suggérée avec le degré de sévérité d'endométriose.

Ces deux études suggérant un lien positif entre l'exposition à plusieurs phtalates et le risque d'endométriose possèdent cependant quelques limites importantes. Elles s'appuient sur des dosages sanguins de phtalates qui ont une demi-vie très courte (<1 heure pour le DEHP). La mesure de l'exposition rétrospective, au moment de l'examen clinique, est ainsi problématique. De plus, les phtalates dosés peuvent être issus du matériel utilisé pour les prélèvements sanguins. Cobellis et coll. (2003) précisent par exemple que le prélèvement sanguin a pu avoir lieu le jour précédent la chirurgie cœlioscopique, pouvant suggérer une contamination des prélèvements pour ces patientes. Aucune autre information permettant d'exclure une contamination, différentielle ou non, des prélèvements sanguins n'est apportée par ces deux études. De plus, les résultats de ces deux études sont descriptifs et ne tiennent pas compte de facteurs de confusion possibles, excepté l'âge des femmes.

Une troisième étude (Itoh et coll., 2009) a proposé d'évaluer l'association entre les dosages urinaires de phtalates et le degré de sévérité d'endométriose parmi 137 femmes japonaises en âge de procréer, ayant consulté pour infertilité et ayant subi un examen cœlioscopique. Les participantes étaient interviewées avec un questionnaire standardisé permettant de prendre en compte différents facteurs de confusion. Les premières urines du matin étaient recueillies avant la cœlioscopie. L'étude a montré que les 6 métabolites analysés dans les urines (MEP, MBP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MBzP) étaient retrouvés dans tous les échantillons ou presque (97 % pour le MBzP). Les niveaux médians les plus élevés de ces métabolites étaient observés chez les patientes atteintes d'endométriose les plus sévères. Les analyses prenant en compte les variabilités individuelles de dilution urinaire (avec la créatinine) n'ont cependant pas mis en évidence de relation dose-réponse.

En résumé, les résultats de cette troisième étude ne confirment pas ceux suggérés par les études italienne et indienne. Les preuves de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose sont à ce jour très limitées.

Tableau 34.III : Études des relations entre phtalates et effets sur l'appareil reproducteur femelle

Référence Type d'étude Pays	Effet étudié	Population	Composés dosés (matrice)	Résultats et commentaires
Colón et coll., 2000 Cas-témoins Porto-Rico	Thélarche précoce	41 filles atteintes (20 mois)/ 35 témoins (36 mois)	DEHP (sérum)	Niveaux plus élevés chez les fillettes atteintes Étude controversée
Lomenick et coll., 2010 Cas-témoins États-Unis	Puberté précoce centrale (CPP)	28 filles atteintes/28 témoins	MBP, MBzP, MCPP, MECPP, MEHHP, MEHP, MEOHP, MEP, MIBP (urines)	Niveaux urinaires comparables entre les deux groupes Mesure d'exposition rétrospective (prélèvement urinaire à l'inclusion)
Chou et coll., 2009 Cas-témoin Taïwan	Puberté précoce centrale (CPP)	26 filles atteintes/30 thélarche précoce isolé /33 témoins	MMP, MBP, MBzP, MEHP (urines)	Aucune différence entre les groupes CPP et témoins Niveaux de MMP plus élevés chez le groupe thélarche prématuré *vs* groupe témoin Mesure d'exposition rétrospective
Wolff et coll., 2010 Cohorte États-Unis	Développement mammaire et pilosité pubienne	Environ 1 000 fillettes	MBzP[a], MCPP[a], MEHP[a], MEOHP[a], MEHHP[a], MECPP[a] MEP[b], MBP[b], MBP[b] (urines)	Somme des niveaux de phtalates de faible poids moléculaire corrélée positivement (force faible) avec les stades de développement mammaire et de pilosité pubienne Somme des niveaux de phtalates de haut poids moléculaire corrélée négativement aux stades de pilosité pubienne
Cobellis et coll., 2003 Cas-témoin Italie	Endométriose	35 femmes atteintes/24 témoins	DEHP, MEHP (sang)	Niveaux DEHP plus élevés chez les femmes atteintes. Pas de différence pour le MEHP Exposition rétrospective Contamination par matériel utilisé ? Absence de prise en compte de facteurs de confusion
Reddy et coll., 2006 Cas-témoin Inde	Endométriose	49 femmes atteintes/59 témoins	DEHP, DBP, BBP, DNOP, DEHP (sang)	Niveaux augmentés avec degré de sévérité. Pas de différence entre cas et témoins Exposition rétrospective Absence de prise en compte de facteurs de confusion
Itoh et coll., 2009 Transversale Japon	Endométriose	137 femmes atteintes et infertiles	MEP, MBP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MBzP (urines)	Pas de relation entre niveaux urinaires et degré de sévérité

Référence Type d'étude Pays	Effet étudié	Population	Composés dosés (matrice)	Résultats et commentaires
Huang et coll., 2009 Transversale Taïwan	Distance anogénitale	31 fillettes	MBP/MEHP (urine mères (n=65) et liquide amniotique)	Distance anogénitale plus courte chez les filles les plus exposées Plus grande sensibilité des fœtus féminins à un effet anti-androgène des phtalates ?

[a] Haut poids moléculaire ; [b] Faible poids moléculaire

En conclusion, les études réalisées chez l'homme ou la femme montrent que certains phtalates sont retrouvés dans les urines, le plasma sanguin, et également dans le plasma séminal.

Une étude (Swan et coll., 2008) a montré pour la première fois une relation entre les métabolites (MEP, MBP, MEHP) et en particulier les métabolites oxydés (MEHHP, MEOHP), et la distance anogénitale chez le garçon à la naissance.

Chez les fillettes, un effet sur la puberté précoce a été essentiellement analysé et les résultats restent divergents.

Il y a, à ce jour, des preuves très limitées pour conclure à l'existence d'un rôle des phtalates sur la survenue des anomalies de l'appareil génital du petit garçon (hypospadias, cryptorchidie). D'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer le rôle possible de l'exposition aux phtalates sur la distance anogénitale et sur le risque de puberté précoce (en particulier chez les fillettes).

La majorité des études chez l'homme adulte retrouvent un lien entre les concentrations de phtalates et une altération des paramètres du sperme dont la concentration et la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Cependant, quelques études ne mettent pas en évidence d'effets des phtalates sur les paramètres du sperme. Par ailleurs, une étude de type exposé/non exposé met en évidence une relation entre des concentrations élevées de phtalates et des concentrations basses de testostérone.

Il faut souligner la difficulté de réaliser une synthèse tant sont différentes les modalités des études (transversale, cas/témoin, exposé/non exposé), les populations étudiées, la méthodologie des dosages et leurs limites de détection ainsi que dans les critères de jugement (*end points*) pris en compte. Par ailleurs, ces études s'intéressent aux phtalates et n'abordent pas les autres facteurs xénobiotiques auxquels les hommes pourraient être exposés. Il semblerait souhaitable de pouvoir réaliser de larges études prenant en compte comme critère de jugement les paramètres de la fonction de reproduction comme les aspects quantitatifs mais également qualitatifs du gamète mais en recherchant l'exposition à plusieurs xénobiotiques et facteurs de risques pour la spermatogenèse.

Peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates sur la santé reproductive des femmes. Seul le risque d'endométriose a été spécifiquement évalué et les preuves apportées par ces quelques études de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose sont insuffisantes. Les effets de l'exposition aux phtalates sur la fonction ovulatoire et certains niveaux hormonaux (œstradiol, progestérone, LH, FSH) suggérés dans les études animales ne sont pas relatés chez la femme.

Bibliographie

CHOU YY, HUANG PC, LEE CC, WU MH, LIN SJ. Phthalate exposure in girls during early puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009, **22** : 69-77

COBELLIS L, LATINI G, DE FELICE C, RAZZI S, PARIS I, et coll. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2003, **18** : 1512-1515

COLON I, CARO D, BOURDONY CJ, ROSARIO O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000, **108** : 895-900

DURMAZ E, ÖZMERT EN, ERKEKOGLU P, GIRAY B, DERMAN O, et coll. Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics* 2010, **125** : e122-e129

DUTY SM, SINGH NP, SILVA MJ, BARR DB, BROCK JW, et coll. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect* 2003a, **111** : 1164-1169

DUTY SM, SILVA MJ, BARR DB, BROCK JW, RYAN L, et coll. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 2003b, **14** : 269-277

DUTY SM, CALAFAT AM, SILVA MJ, RYAN L, HAUSER R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod* 2005, **20** : 604-610

HAN SW, LEE H, HAN SY, LIM DS, JUNG KK, et coll. An exposure assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in human semen. *J Toxicol Environ Health A* 2009, **72** : 1463-1469

HAUSER R. Urinary phthalate metabolites and semen quality : a review of a potential biomarker of susceptibility. *Int J Androl*2008, **31** : 112-117

HAUSER R, CALAFAT AM. Phthalates and human health. *Occup Environ Med* 2005, **62** : 806-818

HAUSER R, MEEKER JD, DUTY S, SILVA MJ, CALAFAT AM. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 2006, **17** : 682-691

HAUSER R, MEEKER JD, SINGH NP, SILVA MJ, RYAN L, et coll. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* 2007, **22** : 688-695

HERR C, ZUR NA, KOCH HM, SCHUPPE HC, FIEBER C, et coll. Urinary di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-Metabolites and male human markers of reproductive function. *Int J Hyg Environ Health* 2009, **212** : 648-653

HUANG PC, KUO PL, CHOU YY, LIN SJ, LEE CC. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 2009, **35** : 14-20

ITOH H, IWASAKI M, HANAOKA T, SASAKI H, TANAKA T, et coll. Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci Total Environ* 2009, **408** : 37-42

JONSSON BA, RICHTHOFF J, RYLANDER L, GIWERCMAN A, HAGMAR L. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* 2005, **16** : 487-493

LATINI G, DE FC, PRESTA G, DELVA, PARISI, et coll. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1783-1785

LOMENICK JP, CALAFAT AM, MELGUIZO CASTRO MS, MIER R, STENGER P, et coll. Phthalate exposure and precocious puberty in females. *J Pediatr* 2010, **156** : 221-225

MAIN KM, MORTENSEN GK, KALEVA MM, BOISEN KA, DAMGAARD IN, et coll. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006, **114** : 270-276

ORMOND G, NIEUWENHUIJSEN MJ, NELSON P, TOLEDANO MB, ISZATT N, et coll. Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias : case-control study. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 303-307

PAN G, HANAOKA T, YOSHIMURA M, ZHANG S, WANG P, et coll. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) : a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect*2006, **114** : 1643-1648

REDDY BS, ROZATI R, REDDY BV, RAMAN NV. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG* 2006, **113** : 515-520

ROZATI R, REDDY PP, REDDANNA P, MUJTABA R. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril* 2002, **78** : 1187-1194

SWAN SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* 2008, **108** : 177-184

SWAN SH, MAIN KM, LIU F, STEWART SL, KRUSE RL, et coll. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005, **113** : 1056-1061

WIRTH JJ, ROSSANO MG, POTTER R, PUSCHECK E, DALY DC, et coll. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Syst Biol Reprod Med* 2008, **54** : 143-154

WOLFF MS, ENGEL SM, BERKOWITZ GS, YE X, SILVA MJ, et coll. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1092-1097

WOLFF MS, TEITELBAUM SL, PINNEY SM, WINDHAM G, LIAO L, et coll. Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytœogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 1039-1046

ZHANG YH, ZHENG LX, CHEN BH. Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai : a cross-sectional study. *Biomed Environ Sci* 2006, **19** : 205-209

ZHANG Y, LIN L, CAO Y, CHEN B, ZHENG L, et coll. Phthalate Levels and Low Birth Weight : A Nested Case-Control Study of Chinese Newborns. *J Pediatr* 2009, **155** : 500-504

35
Études chez les animaux mâles

De nombreuses études de toxicologie ont été publiées sur les phtalates, notamment le DEHP et le DBP. Des études de référence ont permis la définition de la dose journalière tolérable (DJT) pour ces substances. La plupart des études ont été menées avec des doses élevées, sur des périodes d'exposition variables et par voie orale (gavage) chez le rat. Des effets ont été recherchés pour de nombreux paramètres phénotypiques. Quelques études ont été réalisées chez des primates non humains.

Études de références pour détermination de la DJT

Quatre études de références ont servi pour les évaluations de risques liés au DBP et au DEHP par la CPSC et l'EFSA (David et coll., 2000 ; Wolfe et Layton, 2003 ; Lee et coll., 2004 ; Mahood et coll., 2007). Pour le DBP, l'étude de Lee et coll. (2004) et celle de Mahood et coll. (2007) ont adressé les effets d'une exposition *in utero* et/ou postnatale respectivement chez le rat Sprague-Dawley et Wistar. Pour le DEHP, l'étude de David et coll. (2000) a utilisé des rats Fisher âgés de 4 semaines et exposés pendant 2 ans, et celle de Wolfe et Layton (2003) a documenté les effets du DEHP sur plusieurs générations chez le rat Sprague-Dawley.

Dans l'étude de David et coll. (2000), les rats sont exposés à des doses de DEHP de 100 à 12 500 mg/kg de nourriture à partir de la puberté et pendant 104 semaines. Seule la dose la plus forte diminue le poids testiculaire et induit une aspermatogenèse bilatérale (dès 78 semaines). La dose de 500 mg/kg augmente la survenue d'aspermatogenèse chez les animaux âgés (104 semaines). La dose de 500 mg/kg (29-36 mg/kg/j) est considérée comme NOAEL.

L'étude multigénérationnelle de Wolfe et Layton (2003) identifie une toxicité testiculaire dès la dose de 300 mg/kg (23 mg/kg/j pour F0 et 14 mg/kg/j pour F1 et F2) de DEHP dans la nourriture. À cette dose, une atteinte testiculaire est notée chez les animaux des générations F1 et F2. Une pathologie des organes sexuels mâles accessoires (vésicules séminales, prostate, épididyme) est également associée à cette dose. Une baisse de la fertilité n'est rapportée que pour les doses de 7 500 mg/kg (F1, F2 et F3) et 10 000 mg/kg (F0 et F1) selon les paramètres analysés (spermatogenèse, sex ratio des descendants,

nombre de petits par portée...). La dose sans effet pour la toxicité testiculaire proposée est de 100 mg/kg (8 mg/kg/j en F0 et 5 mg/kg/j en F1 et F2).

L'étude de Lee et coll. (2004) concerne les effets d'une exposition au DBP de 20 à 10 000 mg/kg de nourriture pendant la période périnatale du 15e jour de gestation au sevrage, au 21e jour postnatal. À la dose de 2 000 mg/kg, une agrégation des cellules de Leydig et une perte de cellules germinales sont notées respectivement au 21e jour et à 11 semaines (adulte). Une atteinte épididymaire est également rapportée. Ces effets se retrouvent chez quelques animaux dès la dose de 200 mg/kg. Un retard de développement des spermatocytes est évident au 21e jour dès la dose de 20 mg/kg. À 11 semaines, le poids du testicule, de l'épididyme, de la prostate ou des vésicules séminales ne semble pas affecté.

L'étude du groupe de Sharpe (Mahood et coll., 2007) recense différents paramètres précédemment quantifiés dans les travaux de ce groupe et affectés par une exposition strictement fœtale (du jour 13 à 21) tout au long de l'organogenèse testiculaire en réponse à différentes doses de DBP de 4 à 500 mg/kg/j administrées par gavage. Les paramètres précoces tels que la formation d'agrégat de cellules de Leydig, l'apparition de gonocytes multinucléés et la sécrétion de testostérone analysés en fin de vie fœtale (jour 21) sont altérés significativement dès la dose de 100 mg/kg/j. Des paramètres mesurés plus tardivement (adulte) tels que les mesures de fertilité et le taux de cryptorchidisme ne sont affectés qu'à la dose de 500 mg/kg/j. Cette étude révèle également que la disparition de l'épithélium germinal dans certains tubules et l'apparition de foyer dysgénésique (agrégat mal ordonné de plusieurs types cellulaires différents) est retrouvée dans des testicules scrotaux dès la dose de 100 mg/kg/j. Pour plusieurs paramètres, une tendance (non significative) est observée à la dose de 20 mg/kg/j peut-être du fait du nombre modéré de portées analysées (5 à 9). Cette étude est très détaillée et axée spécifiquement autour du développement testiculaire. Les auteurs proposent que les paramètres mesurés en fin de vie fœtale soient les meilleurs indices reflétant une exposition aux phtalates.

Études chez les rongeurs et lagomorphes

La plupart des études chez les rongeurs ont été menées avec des doses élevées. De nombreux effets ont été recherchés sur des périodes d'exposition variables et avec différents phtalates. Les tableaux 35.I et 35.II résument les principaux paramètres phénotypiques affectés avec les deux phtalates DEHP et DBP.

La très grande majorité des études chez l'animal ont été réalisées par gavage par voie orale durant la gestation et rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales.

Tableau 35.I : Paramètres phénotypiques affectés dans les études pour le DEHP

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids testicules, épididymes, prostate, vésicules séminales	Rat Sprague-Dawley Lapin Dutch-belted Rat Wistar Rat Long-Evans Rat Sprague-Dawley castré + testostérone	10-900 Gestation/postnatal	Gray et coll., 2000 Higuchi et coll., 2003 Botelho et coll., 2009 Gray et coll., 2009 Noriega et coll., 2009 Vo et coll., 2009b Lee et Koo, 2007
Modification des paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité %	Rat Sprague-Dawley Lapin Dutch-belted	10-900 Gestation/postnatal	Higuchi et coll., 2003 Vo et coll., 2009a Noriega et coll., 2009
Anomalies Distance anogénitale Cryptorchidie Hypospadias Âge à la séparation du prépuce	Rat Sprague-Dawley Rat Long-Evans	10-1 250 Gestation/postnatal	Gray et coll., 2000 Howdeshell et coll., 2007 Lin et coll., 2008 Culty et coll., 2008 Vo et coll., 2009a Gray et coll., 2009 Noriega et coll., 2009 Vo et coll., 2009b
Altérations des taux hormonaux Testostérone LH, FSH, E2, Insl3	Rat Sprague-Dawley Rat Long-Evans Rat Wistar Lapin Dutch-belted	10-1 250 Gestation/postnatal	Akingbemi et coll., 2001 Higuchi et coll., 2003 Borch et coll., 2004 Akingbemi et coll., 2004 Howdeshell et coll., 2007 Lin et coll., 2008 Culty et coll., 2008 Vo et coll., 2009a Vo et coll., 2009b Noriega et coll., 2009

Tableau 35.II : Paramètres phénotypiques affectés dans les études pour le DBP

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids testicules, épididymes, prostate, vésicules séminales	Rat Long-Evans (ORL) Rat Wistar Rat Sprague-Dawley Rat Sprague-Dawley (hypothyroi-dien/PTU) Rat Sprague-Dawley castré + testostérone	50-750 Gestation/postnatal	Johnson et coll., 2008 Zhu et coll., 2009 Drake et coll., 2009 Martino-Andrade et coll., 2009 Welsh et coll., 2009 MacLeod et coll., 2010 Saillenfait et coll., 2008 Lee et coll., 2008 Lee et Koo, 2007 Boekelheide et coll., 2009
Modification des paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité %	Rat Wistar	500-1 500 Adulte	Nair et coll., 2008
Anomalies Distance anogénitale Cryptorchidie Hypospadias Âge à la séparation du prépuce	Rat Wistar Rat Sprague-Dawley	100-750 Gestation	Fisher et coll., 2003 Howdeshell et coll., 2007 Saillenfait et coll., 2008 Scott et coll., 2008 Martino-Andrade et coll., 2009 Welsh et coll., 2009 Struve et coll., 2009 Zhu et coll., 2009 Scarano et coll., 2009 Drake et coll., 2009 MacLeod et coll., 2010
Altérations des taux hormonaux Testostérone LH, FSH, Insl3	Rat Wistar Rat Sprague-Dawley	100-500-1 500 Gestation/postnatal Adulte	Fisher et coll., 2003 Howdeshell et coll., 2007 Scott et coll., 2008 Nair et coll., 2008 Johnson et coll., 2008 Drake et coll., 2009 Struve et coll., 2009 Martino-Andrade et coll., 2009 Alam et coll., 2010 MacLeod et coll., 2010

Effets *in utero* sur le testicule fœtal

De nombreux travaux signalent de manière cohérente : une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'Insl3 de ces cellules ; une augmentation du diamètre des cordons testiculaires ; l'apparition de gonocytes (cellules germinales fœtales) multinucléés. Notons immédiatement que le mode typique d'administration des phtalates, sous forme de bolus quotidiens par gavage par voie orale ou intubation gastrique, produit à peu près les mêmes effets que l'exposition via la nourriture à dose équivalente, au moins pour le DBP (Struve et coll., 2009). Par ailleurs, il a été démontré que le DEHP passe efficacement la barrière placentaire et atteint les gonades chez le rat en administrant du DEHP radioactif par voie orale aux rates gestantes (Stroheker et coll., 2006). On estime que de 2 à 5 % de la radioactivité totale du fœtus se retrouvent au niveau des gonades.

Effets sur les cellules de Leydig

Concernant les cellules de Leydig, une diminution de la production de testostérone testiculaire en fin de vie fœtale est rapportée de manière quasi-systématique chez le rat. Ainsi, chez le rat de lignée Wistar, l'administration de 500 mg/kg/j de DBP à la femelle gestante diminue la testostérone intra-testiculaire du fœtus de manière drastique (Fisher et coll., 2003 ; Scott et coll., 2008 ; Drake et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009 ; MacLeod et coll., 2010). L'exposition *in utero* au DINP (750 mg/kg/j), au DEHP (750 mg/kg/j), ou au DIBP (600 mg/kg/j) induit un effet semblable (Borch et coll., 2004 ; Boberg et coll., 2008). Des doses moindres de DBP (<100 mg/kg/j) ou de DEHP (150 mg/kg/j) n'inhibent pas de manière visible la production de testostérone durant la vie fœtale (Drake et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009). Cependant, l'administration simultanée de DBP (100 mg/kg/j) et de DEHP (150 mg/kg/j) induit des effets semblables à une forte dose de DBP (Martino-Andrade et coll., 2009). Chez le rat de lignée Long-Evans, le DEHP (750 mg/kg/j) administré du 2e au 20e jour de la gestation inhibe également la sécrétion de testostérone fœtale au jour 21 (Lin et coll., 2008). Vo et coll. (2009a) indiquent un effet semblable chez le rat de lignée Sprague-Dawley lors d'un gavage au DEHP (500 mg/kg/j) du 11e au 20e jour de la gestation. Des doses plus faibles de DEHP (dès 117 mg/kg/j) diminuent également la sécrétion de testostérone et de DHT chez le rat Sprague-Dawley. De même, Struve et coll. (2009) démontrent que le DBP mélangé à l'alimentation des femelles gestante du 12e au 19e jour de la gestation diminue la testostérone intra-testiculaire dès les doses équivalentes à 100 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley. Toujours dans cette lignée, le DBP ou le DEHP à la dose de 500 mg/kg/j chacun diminuent la sécrétion de testostérone et leurs effets peuvent se cumuler lorsqu'ils sont administrés du 14e au 18e jour de gestation (Howdeshell et coll., 2007). Il semble donc largement prouvé que le DBP et/ou le DEHP administré aux rates gestantes inhibe l'activité stéroïdogène du testicule fœtal dans diverses lignées de rats. La lignée Sprague-Dawley apparaît comme plus sensible que la lignée Wistar.

Le groupe de Richard Sharpe a longuement étudié le modèle du rat Wistar gavé avec 500 mg/kg/j de DBP pendant la gestation. Ces auteurs ont ainsi précisé la fenêtre pendant laquelle le DBP réduit la production de testostérone fœtale. Ainsi, la testostéronémie chute fortement à partir du 17e jour de gestation et cette diminution se maintient jusqu'au 21e jour de gestation lors d'une exposition du 13e au 21e jour (MacLeod et coll., 2010). Ils ont également montré qu'une courte exposition du 19e au 20e jour est suffisante pour inhiber la sécrétion de testostérone au jour 21 (Scott et coll., 2008). Cependant, lors d'une exposition de du 13e au 15e ou du 15e au 17e, on n'observe pas de diminution de la testostéronémie au jour 21. Il apparaît donc que les effets sur la production de testostérone fœtale disparaissent rapidement après l'arrêt du gavage. D'autres auteurs (Akingbemi et coll., 2001) ont gavé des rates de lignée Long Evans pendant la gestation (du 12e au 21e jour) avec 100 mg/kg/j de DEHP et observent une diminution de testostéronémie des mâles nés de ces animaux pendant la puberté (21-35 jours) mais cet effet est transitoire puisqu'à l'âge adulte (90 jours) le taux de testostérone est restauré. La plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale semble s'accorder sur ce dernier point : à l'âge adulte, les taux plasmatique de testostérone des mâle traités *in utero* sont comparables à ceux d'animaux non exposés (Gray et coll., 2000 ; Fisher et coll., 2003 ; Borch et coll., 2004 ; Gray et coll., 2009 ; Scarano et coll., 2009). Une baisse de la testostéronémie pendant la période pubertaire a également été rapportée par Lin et coll. (2009) chez le rat pour une exposition à des doses relativement faibles de DEHP (10 mg/kg/j) pendant la gestation. Cependant, cet effet inhibiteur pendant la période pubertaire n'est pas retrouvé systématiquement (Borch et coll., 2005).

Les mécanismes responsables de la diminution de la synthèse de testostérone suivant immédiatement une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat ont été décrits dans plusieurs études et des résultats concordants décrivent une diminution de l'expression des enzymes de transport du cholestérol et de biosynthèse des hormones stéroïdes. Les gènes dont l'expression est diminuée de manière cohérente avec les effets rapportés et indépendamment de la nature du phtalate ou de la lignée sont : *P450scc* (*Cyp11a1*), *StAR*, *Cyp17a1* et *Srb1* (Boberg et coll., 2008 ; Johnson et coll., 2008 ; Drake et coll., 2009 ; Lin et coll., 2009 ; Struve et coll., 2009 ; Vo et coll., 2009a). Notons que la diminution de l'expression de la 17βHSD, de SF1 ou du récepteur à LH a également été notée dans certaines études (Boberg et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008 et 2009). Ce blocage des différentes étapes clefs de la stéroïdogenèse du testicule fœtal explique probablement l'effet net sur la production de testostérone fœtale mais il n'a pas été démontré que les phtalates ou leurs dérivés agissaient directement sur l'expression de ces gènes.

Les conséquences d'une inhibition de la synthèse de testostérone fœtale sont clairement visibles et encore plus fréquemment rapportées chez les rats traités durant la gestation. Ainsi, différents défauts de masculinisation sont décrits :

une diminution de la distance anogénitale, la rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons chez le mâle, la diminution de la longueur du pénis, une baisse du poids de la prostate, une augmentation des hypospadias et du taux de cryptorchidie. Une diminution marquée de la distance anogénitale est décrite dans les jours qui suivent la naissance (Gray et coll., 2000 ; Ema et Miyaki., 2001 ; Borch et coll., 2004 ; Howdeschell et coll., 2007 ; Lin et coll., 2008 ; Saillenfait et coll., 2008 ; Scott et coll., 2008 ; Drake et coll., 2009 ; Gray et coll., 2009 ; Lin et coll., 2009 ; Mac Leod et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009 ; Saillenfait et coll., 2009 ; Vo et coll., 2009a ; Yamasaki et coll., 2009 ; Zhu et coll., 2009). De très nombreuses études ont utilisé ce paramètre qui représente un marqueur fiable de l'imprégnation androgénique du fœtus et ne nécessite pas le sacrifice de l'animal. Il a ainsi été montré que ce paramètre est diminué par divers phatalates, DEHP, DBP, MBP, BBP, DIBP, DnHP (di-n-hexyl-phtalate) et DCHP (dicyclohexyl-phtalate) et à des doses qui concordent généralement avec les effets observés sur la sécrétion de testostérone (de 250 à 750 mg/kg/j) chez les trois lignées de rats précédemment citées. Notons ici que si les doses de l'ordre de 10 mg/kg/j semblent clairement inefficaces, certains auteurs rapportent un effet du DEHP dès 100 mg/kg/j (Vo et coll., 2009a) et d'autres auteurs n'indiquent pas d'effet à une dose proche (Martino-Andrade et coll., 2009). Une explication plausible serait que les premiers auteurs utilisent la lignée de rat Sprague-Dawley et les seconds, la lignée Wistar, lignée qui semble moins sensible aux effets des phtalates sur la stéroïdogenèse. D'autres phtalates (DEP, DMP et dioctyl terephtalate (DEHT ou DOTP)) à la dose de 750 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley semblent inefficaces sur ce paramètre (Gray et coll., 2000). De manière très intéressante, deux études ont délimité finement la période d'exposition minimale induisant une diminution de la distance anogénitale (Ema et coll., 2001 ; Scott et coll., 2008) ; cette période du 15e au 17e jour de gestation correspond à la « fenêtre de programmation mâle », un concept proposé par R. Sharpe. Ainsi chez le rat Wistar, une exposition au DBP (150-500 mg/kg/j) durant toute la fin de la vie fœtale (du 13e au 21e jour) ou uniquement pendant la fenêtre du 15 au 17e jour diminue sensiblement également la distance anogénitale bien que dans le second cas la chute de la sécrétion de testostérone ait été très transitoire. La différenciation et le développement de nombreux organes du tractus reproducteur mâle sont androgéno-dépendants. Ainsi, une diminution à la puberté ou à l'âge adulte du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et du muscle levator ani-bulbocaverneux sont couramment signalés dans ces études. Un retard de l'âge de la séparation du prépuce, un indice de la puberté chez le mâle, est parfois rapporté. Une diminution du poids testiculaire ou épididymaire est également fréquemment décrite mais il est peu clair si celle-ci fait suite à une atteinte directe du testicule ou est secondaire à la cryptorchidie.

Une autre hormone produite par les cellules de Leydig durant la vie fœtale, l'InsL3 (*relaxin/insulin like 3*) apparaît comme inhibée lors d'une exposition *in utero* aux phtalates. La diminution de l'expression de ce gène pendant la vie

fœtale ou néonatale a été décrite pour des doses de 200 à 750 mg/kg/j chez les trois lignées de rats en réponse à une exposition *in utero* au DIBP, au DEHP ou au DBP (Howdeshell et coll., 2007 ; Boberg et coll., 2008 ; Culty et coll., 2008 ; Johnson et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008 et 2009). Rappelons que cette hormone permet entre autre la croissance du gubernaculum, un ligament responsable de la descente des testicules. Il semble donc logique d'attribuer au moins en partie la cryptorchidie induite par une exposition *in utero* aux phtalates à l'inhibition de la sécrétion de cette hormone leydigienne. Notons ici que pour des doses voisines de l'ordre de 500 mg/kg/j (13-21e jour de gestation), des taux de presque 100 % de cryptorchidie sont décrits chez le rat de lignée Wistar alors que seuls 7 à 8 % des rats de lignées Sprague-Dawley sont atteints (Howdeshell et coll., 2008). Une explication possible à cette différence serait le taux basal d'Insl3 qui est plus important chez les rats Sprague-Dawley en comparaison aux animaux de lignée Wistar.

Enfin, des cas drastiques d'agénésie épididymaire sont rapportés en réponse aux phtalates *in utero*. Ici, c'est au contraire les rats de lignées Sprague-Dawley qui semblent plus atteints que les lignées Wistar, respectivement 82 % contre 12 % en réponse à 500 mg/kg/j de DBP (Howdeshell et coll., 2008). Ceci peut également être expliqué par une sécrétion de testostérone basale plus importante chez les animaux de lignées Wistar. Il est intéressant de noter ici que l'épididyme dérive des canaux de Wolf, structure embryonnaire dont le maintien et la croissance dépend du taux d'androgènes pendant la vie fœtale. Les groupes de P. Saunders et R. Sharpe (Welsh et coll., 2009) se sont intéressés à la croissance de ces canaux en traitant des rats Wistar avec une dose de flutamide, un anti-androgène (100 mg/kg) et de DPB (500 mg/kg) à partir du 14e jour de gestation. Les auteurs rapportent que la combinaison de ces deux anti-androgènes induit la régression complète de ces canaux alors que la flutamide seule n'a que peu d'effet. L'effet décrit est comparable à celui de souris déficientes pour le récepteur aux androgènes. Il semble donc que le DBP en combinaison avec la flutamide puisse totalement bloquer la signalisation androgénique.

La question de la dose sans effet de phtalates a été abordée par la plupart des études décrivant une exposition *in utero* et comme décrit ci-dessus, très peu rapportent un effet à des doses inférieures à 150 mg/kg/j. Notons cependant que des effets cumulatifs de différents phtalates ont été rapportés. Ainsi Howdeshell et coll. (2007) montrent des effets du DBP et du DEHP seuls à la dose de 500 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley pendant la gestation (14-18e jour de gestation). Ces effets apparaissent amplifiés lorsque ces deux phtalates sont administrés simultanément, une augmentation du taux d'hypospadias et des effets persistant chez l'adulte étant alors notée de manière significative. Martino-Andrade et coll. (2009) ont adressé une question similaire en utilisant cette fois des doses plus faibles de DBP (100 mg/kg/j) et de DEHP (150 mg/kg/j) chez le rat Wistar. Les auteurs rapportent que seuls ces phtalates n'ont pas d'effet sur la sécrétion de testostérone ou la distance anogénitale

mais qu'en combinaison, ils ont des effets similaires à une dose de 500 mg/kg/j de DBP, diminuant ces deux paramètres. Cependant, aucun effet persistant chez l'adulte n'est décrit dans cette dernière expérience. Enfin, citons l'étude très détaillée de Gray et coll. (2009). Dans leurs travaux, les auteurs ont exposé au cours de la gestation et au début de la vie postnatale, des rats Sprague-Dawley à des doses allant de 11 à 300 mg/kg/j de DEHP et ont analysé l'âge de la séparation du prépuce, la persistance d'aréoles mammaires, les anomalies testiculaires (lésions), les anomalies de l'épididyme, des vésicules séminales du ligament du gubernaculum et rassemblé toutes ces lésions de l'appareil reproducteur mâle sous l'appellation de « syndrome des phtalates ». Les auteurs ont également analysé tous les animaux issus de toutes les portées (en général un effectif de plus 70 rats issus d'au moins 10 portées) alors que dans la plupart des autres études seuls quelques animaux par portée sont analysés (en moyenne 10 au total). Gray et coll. (2009) rapportent alors un effet statistiquement significatif du DEHP sur ce syndrome dès la dose de 11 mg/kg/j. À cette dose, environ 10 % des animaux présentent des malformations du tractus reproducteur mâle (8/71) et près de 50 % des rats à la dose de 300 mg/kg (38/74) mais aucun des animaux temoins (0/83) n'est atteint. Dans ces travaux, les auteurs ont dosé le MEHP, un métabolite du DEHP, dans le fluide amniotique et observent des taux de 7,2, 68 et 2 324 ng/ml respectivement chez les animaux témoins et les animaux exposés à 11 et 300 mg/kg/j de DEHP. Il semble donc que chez le rat, une partie des animaux soit affectée par des doses relativement faibles correspondant à un équivalent de 68 ng/ml de MEHP circulant. Cette étude pousse à l'extrême la notion d'analyse statistique mais dans plusieurs autres travaux une exposition *in utero* à des doses de 10 à 100 mg/kg/j de phtalates ne modifie pas significativement un paramètre mais augmente sa dispersion spécifiquement chez les animaux traités. Bien qu'il soit difficilement concevable de réaliser régulièrement des études aussi détaillées, il semble que certaines sous-populations puissent être plus sensibles.

De manière intéressante, le groupe de R. Sharpe a identifié un paramètre pouvant accroître la sensibilité *in utero* aux phtalates (Drake et coll., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont gavé des rates gestantes (lignée Wistar, 13-21e jour de gestation) avec 100 ou 500 mg/kg/j de DBP et/ou 0,1 mg/kg/j de dexaméthasone. La dexaméthasone seule n'a aucun effet en elle-même sur les paramètres étudiés mais amplifie ou révèle les effets du DBP notamment sur la distance anogénitale et le poids testiculaire. Les effets de ce glucocorticoïde suggèrent que le stress pourrait sensibiliser à l'action des phtalates. Une autre étude propose que des facteurs génétiques puissent accroître la sensibilité aux phtalates (Johnson et coll., 2008). Les auteurs ont utilisé une sous-lignée de rat dérivée des rats Long-Evans, la lignée ORL. Cette sous-lignée présente à l'état basal un taux de 60 % de cryptorchidie due à un défaut polygénétique, mal caractérisé, et affectant la croissance du gubernaculum. Dans cette sous-lignée, une exposition *in utero* au DBP réduit l'expression des enzymes de synthèse des androgènes (P450scc et StAR) et de l'InsL3 et diminue le poids testiculaire

dès la dose de 50 mg/kg/j alors que cette dose n'a pas ou peu d'effet chez des rats Long-Evans normaux. Les auteurs proposent donc ce modèle comme un exemple d'interaction gène-environnement ; le fond génétique ORL sensibiliserait aux effets des phtalates favorisant la survenue de malformations des organes reproducteurs en réponse à des doses plus faibles.

Notons enfin qu'en plus de la fonction endocrine, l'aspect histologique des cellules de Leydig fœtales est altéré par une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat. Ainsi plusieurs groupes rapportent l'agrégation des cellules de Leydig et la formation de clusters hétérogènes chez les mâles exposés (Gray et coll., 2000 ; Fisher et coll., 2003 ; Borch et coll., 2005 ; Culty et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008 et 2009). Cette hyperplasie leydigienne sous forme de clusters ne semble pas être due à une augmentation de la prolifération des cellules de Leydig différenciées. L'apparition de foyers hyperplasiques est rapportée pour de fortes doses (500 à 938 mg/kg/j) mais une hausse du volume leydigien global est détectée dès 234 mg/kg/j (Culty et coll., 2008). Ces foyers hyperplasiques sont détectables dès la vie fœtale (17e jour de gestation) et semblent se maintenir chez l'adulte (90 jours) tout au moins pour les fortes doses (Fisher et coll., 2003). En réalisant une étude fine du nombre de cellules de Leydig par cluster, Lin et coll. (2008 et 2009) ont détecté une augmentation des clusters contenant de 6 à 30 cellules pour des doses de l'ordre de 10 mg/kg/j de DEHP alors que les agrégats contenant plus de 30 cellules n'apparaissent que pour de fortes doses (750 mg/kg/j) en fin de vie fœtale. Enfin, les foyers de cellules de Leydig ont été décrits comme très hétérogènes contenant également des cellules de Sertoli ou des gonocytes mal localisés. Les cellules de Leydig apparaissent elles-mêmes parfois mal localisées puisque Fisher et coll. (2003) rapportent la présence de cellules positives pour 3bHSD au sein même des cordons testiculaires (alors qu'elles se situent normalement entre les cordons) en réponse aux phtalates. Le LIF (*Leukemia Inhibiting Factor*) a été identifié comme une cytokine qui peut induire l'agrégation des cellules de Leydig *in vitro* et l'expression de cette cytokine est augmentée dans le testicule fœtal en réponse au DEHP (Lin et coll., 2008) ; il est ainsi possible que cette cytokine soit un des médiateurs des effets des phtalates sur les cellules de Leydig fœtales. Il semble donc que la différenciation des cellules de Leydig fœtales soit globalement affectée chez le rat sur le plan cellulaire et fonctionnel.

En comparaison de la bibliographie abondante chez le rat, très peu d'études ont abordé les effets des phtalates *in utero* dans d'autres modèles animaux. Higuchi et coll. (2003) ont évalué les effets du DEHP administré par voie orale à la dose de 400 mg/kg/j chez le lapin Dutch-belted pendant la gestation (15-29e jour de gestation). Les effets présentés par les auteurs sont alors très semblables à ceux décrits chez le rat. La testostéronémie chute en période prébubère (6 semaines) puis revient à la normale chez l'adulte et une diminution du poids testiculaire et du poids des glandes annexes des animaux exposés *in utero* est observée. Gaido et coll. (2007) ont étudié en détail les effets des phtalates chez la souris. Trois lignées de souris différentes, CD1, C57Bl/6J et

C3H/HeJ, ainsi que trois phtalates ont été utilisés, DBP, MBP et MEHP. Les gavages ont été réalisés pendant la gestation (18e jour, 15-16e jour, 15-17e jour et 14-17e jour) avec des doses de 250 à 1 500 mg/kg/j. Les protocoles utilisés sont semblables à ceux décrits chez le rat. Cependant, aucune diminution de la testostérone testiculaire fœtale n'a pu être observée par ces auteurs, quelle que soit la dose, la nature du phtalate ou la lignée de souris. Par exemple, une exposition à 1 500 mg/kg/j de DBP (14-16e jour) ne diminue pas la production de testostérone dans la lignée C57Bl/6J. Par ailleurs, aucune diminution des ARNm de StAR, P450scc, Cyp17a1 ou Srb1 n'est observée. Les auteurs ont également mesuré le taux de MBP, lors d'une exposition au DBP, dans le plasma fœtal et maternel et observent des doses similaires à celles décrites chez le rat. Ce point indique donc que la métabolisation du phtalate ne semble pas être différente chez ces deux espèces. Il apparaît donc que chez la souris, les gènes impliqués dans le transport du cholestérol et la biosynthèse de la testostérone, ne sont pas affectés par une exposition *in utero* aux phtalates. Ce travail pose la question de savoir si les effets observés chez le rat sont spécifiques de cette dernière espèce.

En résumé, de très nombreux travaux ont démontré qu'une exposition *in utero* à des fortes doses d'un phtalate altère de manière importante la morphologie et la fonction des cellules de Leydig de rat. Celle-ci inhibe la sécrétion des deux principales hormones, InsL3 et testostérone, pendant la vie fœtale chez le rat et donc la masculinisation ou le développement des organes reproducteurs androgéno-dépendant. Cet effet semble, au moins en partie, conservé chez le lapin mais est absent chez la souris, posant ainsi la question de savoir quel est le modèle animal le mieux adapté pour prédire les effets chez l'homme. Chez le rat, d'importantes différences ont été observées en fonction de la lignée ou sous-lignée suggérant une composante importante du fond génétique. Enfin, il est encore incertain si ces effets anti-androgéniques sont uniquement dépendants d'une exposition à de fortes doses ou si ces effets peuvent se manifester à des doses beaucoup plus faibles chez certains animaux ou lors d'une exposition à un mélange de divers phtalates ou/et de facteurs anti-androgéniques. Quelques travaux suggèrent que tel pourrait être le cas mais ceux-ci sont encore à confirmer.

Effets sur les cellules de Sertoli

Concernant les cellules de Sertoli, plusieurs études du groupe de R. Sharpe ont décrit des effets sur ce type cellulaire lors d'une exposition *in utero*. Le modèle utilisé par ce groupe est essentiellement le rat Wistar gavé au DBP (500 mg/kg/j) pendant la gestation (Fisher et coll., 2003 ; Scott et coll., 2008 ; Auharek et coll., 2010). Dans ce modèle, un gavage pendant toute l'organogenèse testiculaire (13e au 21e jour de gestation) induit une chute importante, de l'ordre de 50 %, du nombre de cellules de Sertoli en fin de gestation mais dès la puberté (25 jours) et à l'âge adulte (90 jours) ce nombre est restauré (Fisher et coll., 2003). Les cellules de Sertoli apparaissent donc comme un second type testiculaire sensible aux effets des phtalates *in utero*. Le

même groupe a démontré que la prolifération des cellules de Sertoli est réduite en réponse à une exposition aux phtalates *in utero* (Scott et coll., 2008). En faisant jouer la fenêtre d'exposition, les auteurs indiquent qu'une exposition en toute fin de vie fœtale (19e-20e jour de gestation) suffit pour diminuer le nombre de cellules de Sertoli alors qu'une exposition plus précoce (15e à 17e jour de gestation) est sans effet sur ce paramètre. Il semble donc que la fenêtre de sensibilité des cellules de Sertoli se situe un peu après celle décrite pour la distance anogénitale. De plus, l'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli apparaît corrélée à l'inhibition de la synthèse de testostérone induite par le DBP. Récemment, ce groupe a démontré que pendant la période postnatale, la prolifération des cellules de Sertoli est accrue chez les animaux exposés *in utero* expliquant ainsi la compensation observée du nombre de ces cellules dès la puberté. Cette compensation postnatale semble être due à l'action des androgènes puisqu'elle peut être bloquée par l'administration de flutamide après la naissance (Auharek et coll., 2010). Notons ici que dans la même étude les auteurs décrivent également une diminution du nombre de cellules de Sertoli persistant à la puberté si l'exposition aux phtalates *in utero* est poursuivie par une exposition via la lactation jusqu'au 15e jour postnatal. L'ensemble de ces données apparaît globalement cohérent puisque l'on sait qu'en fin de vie fœtale les cellules de Sertoli acquièrent le récepteur aux androgènes et que ceux-ci stimulent la prolifération de ces cellules. Rappelons que les cellules de Sertoli sont les cellules de soutien des cellules germinales et que leur prolifération s'arrête avant la puberté. Cette diminution de la prolifération des cellules de Sertoli semble être la cause de la diminution du poids testiculaire à la naissance lors d'une exposition aux phtalates pendant la gestation rapportée par de nombreux auteurs (Fisher et coll., 2003 ; Jonhson et coll., 2008 ; Boekelheide et coll., 2009) et également retrouvée chez le lapin (Higushi et coll., 2003). En effet, les cellules de Sertoli sont le type cellulaire majoritaire dans le testicule en fin de vie fœtale. D'autres auteurs ont également rapporté une atteinte sertolienne avec notamment l'existence de foyers dysplasiques contenant des cellules positives pour l'AMH, un marqueur sertolien, mélangées avec des cellules de Leydig et des cellules péritubulaires (Borch et coll., 2005). Ces cellules de Sertoli sont décrites par les auteurs comme des cellules ayant échoué à former des cordons testiculaires. Cette hypothèse d'une malformation des cordons induite par une exposition *in utero* induisant des foyers dysgénésiques dans le testicule apparaît logique mais n'a pas formellement été prouvée. Cependant, Fisher et coll. (2003) rapportent également l'existence de foyers de cellules de Sertoli immatures qui persistent à l'age adulte (90 jours). Les auteurs identifient ces cellules immatures de par leur absence d'expression de P27, un inhibiteur du cycle cellulaire. Enfin chez le rat et le lapin, il a également été rapporté l'induction de foyers dits « *Sertoli Cell Only* » (SCO) qui correspondent à des zones contenant des tubules dépourvus de cellules germinales (Fisher et coll., 2003 : Higuchi et coll., 2003). Fisher et coll. (2003) rapportent de surcroît une diminution du nombre de spermatocytes par cellule de Sertoli à la puberté (25 jours), interprétée

par les auteurs comme une diminution de la capacité des cellules de Sertoli à soutenir les cellules germinales.

En résumé, le nombre et la prolifération des cellules de Sertoli peuvent être inhibés transitoirement lors d'une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat. Il est encore incertain si cet effet des phtalates résulte d'une atteinte directe de ces cellules mais un effet indirect via l'inhibition de la synthèse d'androgènes est probable. Le modèle murin, qui ne présente pas d'inhibition de la production de testostérone, n'a que peu été étudié vis-à-vis des cellules de Sertoli lors d'une exposition gestationnelle aux phtalates. Seule une augmentation du diamètre des cordons testiculaires est rapportée en fin de vie fœtale (Gaido et coll., 2007). Cet effet a également été décrit chez le rat mais bien qu'attribué aux cellules de Sertoli, cet effet pourrait également être le fait d'une atteinte germinale (l'autre composante des cordons).

Effets sur les cellules germinales

Concernant les cellules germinales, le phénomène le plus visible immédiatement après une exposition *in utero* aux phtalates est l'apparition de cellules germinales anormales, multinucléées. Ces cellules ont été décrites chez le rat et la souris dans toutes les lignées précédemment citées et principalement en réponse au DBP et au DEHP (Fisher et coll., 2003 ; Borch et coll., 2005 ; Gaido et coll., 2007 ; Jonhson et coll., 2008 ; Boekelheide et coll., 2009 ; Martino-Andrade et coll., 2009). Il semble que des doses supérieures ou égales à 100 mg/kg/j soient nécessaires pour induire l'apparition de ces gonocytes multinucléés. Ces cellules sont observées en fin de vie fœtale et disparaissent peu après la naissance vers 10 jours (Fisher et coll., 2003). À cet âge, une diminution du nombre des cellules germinales est observée. Les mécanismes moléculaires impliqués sont totalement inconnus mais un lien avec la chute du taux de testostérone peut clairement être exclu puisque cet effet est retrouvé chez la souris. Notons ici que peu d'études ont détaillé la prolifération ou l'apoptose des cellules germinales fœtales. Dans ce cadre, l'étude de Ferrara et coll. (2006) revêt un intérêt particulier car elle décrit un retard de la différenciation mâle des cellules germinales fœtales chez le rat en réponse à une exposition au DBP. Une étape importante du développement de la lignée germinale mâle chez les rongeurs est l'apparition d'une phase de quiescence caractéristique en fin de vie fœtale. C'est durant cette phase que l'empreinte parentale se met en place. Les auteurs ont gavé des rates Wistar avec 500 mg/kg/j de DBP à partir du 13e jour de gestation et rapportent alors une augmentation de l'expression d'OCT4, de pRb, de Ki67 dans les cellules germinales, des marqueurs de « multipotence » et de prolifération qui disparaissent en temps normal lors de l'entrée en quiescence. Ce maintien de cellules indifférenciées s'accompagne également d'une hausse de l'apoptose (d'un facteur 2 à 4) des cellules germinales dès le 15e et 17e jour de gestation. Les auteurs rapportent que l'apparition de gonocytes multinucléés (augmentation d'un facteur 10) est plus tardive, dès le 21e jour de gestation, et dissociable du phénomène du retard de différenciation. En effet, une exposition au DBP,

pendant la phase de quiescence, (19-20e jour de gestation) suffit à induire l'apparition de cellules multinucléées. Les auteurs identifient également que seul l'effet précoce du DBP (13-20e jour de gestation) retardant l'entrée en quiescence réduit le nombre de cellules germinales de manière conséquente : 37 % au jour 21 de gestation, 53 % au 4e jour postnatal et 80 % entre le 8 et 15e jour postnatal mais de manière transitoire puisque ce nombre est restauré entre 25 et 80 jours postnatals du fait d'une augmentation de la prolifération des cellules germinales postnatales. Cet effet précoce d'une exposition aux phtalates est particulièrement intéressant car il est actuellemment admis qu'une non-différenciation de certains gonocytes pourrait être à l'origine des carcinomes *in situ* (CIS) testiculaires avec lesquels ils partagent de nombreux marqueurs communs. Notons cependant qu'aucun CIS n'a été décrit chez le rat adulte après une exposition *in utero* aux phtalates. À long terme, quelques rares études rapportent une augmentation de cellules germinales dégénérescentes ou l'apparition de SCO sans qu'il soit certain qu'une atteinte des cellules germinales soit en cause (Yamasaki et coll., 2009). Chez le lapin (Higuchi et coll., 2003), une diminution du nombre de spermatozoïdes éjaculés sans changement du nombre de spermatozoïdes épididymaires a été rapportée. Une augmentation des formes anormales (anomalies acrosomiques et nucléaires) est également décrite dans cette espèce. Enfin, notons que très peu d'études ont analysé la fertilité, une fois adulte, des mâles exposés *in utero*. Fisher et coll. (2003) rapportent que seuls 2 rats sur 10 sont fertiles après une exposition *in utero* au DBP (500 mg/kg/j) mais dans cette même étude presque tous les animaux présentent une crytorchidie uni- ou bilatérale. Il est donc probable que cette stérilité soit secondaire à la cryptorchidie. De manière plus intéressante, le poids du testicule à l'âge adulte n'est pas diminué dans les testicules non-cryptorchides dans cette étude. Globalement, la spermatogenèse semble donc prendre place après une exposition *in utero* mais quelques altérations subtiles ont été décrites.

Effets lors d'une exposition périnatale

Plusieurs auteurs ont adressé la question de savoir si les phtalates pouvaient également agir comme des anti-androgènes en inhibant la croissance des organes androgéno-dépendants à travers une exposition par voie orale pendant la gestation et pendant la lactation. En effet, les androgènes sont également importants pour la croissance postnatale des organes reproducteurs mâles. Tous ces travaux ont été menés chez le rat. En règle générale, les effets d'une exposition *in utero* et pendant la lactation sont supérieurs à ceux induits uniquement pendant la gestation. Ainsi, Gray et coll. (2009) ont exposé des rats Sprague-Dawley du 8e jour de gestation au 17e jour de vie postnatale à 300 mg/kg/j de DEHP et analysé les effets chez l'adulte (65 jours). Les auteurs décrivent alors une diminution du poids des testicules de la prostate ventrale et des vésicules séminales qui s'accompagne d'une diminution du nombre de spermatozoïdes. Un protocole similaire chez le rat Long-Evans a permis de

mettre en évidence un effet inhibiteur sur la testostérone plasmatique et sur l'expression des enzymes de biosynthèse de cette hormone pendant la puberté (21 jours) avec des doses de 10 mg/kg/j de DEHP (Lin et coll., 2009). Cet effet est transitoire disparaissant à 49 jours mais persiste pour des doses plus fortes (750 mg/kg/j). Ainsi aux faibles doses, l'effet du DEHP disparaît peu après l'arrêt du traitement, et aux fortes doses de DEHP un effet inhibiteur à long terme de la stéroïdogenèse peut persister au moins 4 semaines après l'arrêt du traitement. Notons ici que cet effet s'accompagne d'une diminution de l'expression du récepteur à la LH. Mac Leod et coll. (2010) ont comparé les effets d'une exposition *in utero* et/ou postnatale chez le rat Wistar exposé à 500 mg/kg/j de DBP. L'exposition *in utero* et lactationnelle diminue, de manière plus importante que l'exposition *in utero* seule, la distance anogénitale et la longueur du pénis mesurés à la puberté (25 jours). De manière intéressante, les auteurs ont comparé ces effets à ceux d'une exposition uniquement lactationnelle/postnatale ; ces deux paramètres ne sont alors pas affectés bien que l'administration de testostérone pendant la même période augmente la distance anogénitale et la longueur du pénis. D'autres études similaires décrivent également un retard de la puberté se traduisant par un retard de l'âge de la séparation du prépuce, et la persistance de structure mammaire chez le mâle ou une diminution du poids du muscle levator-bulbocaverneux lors d'une exposition continue de la vie fœtale à la puberté (Yamasaki et coll., 2009). Rappelons ici qu'une diminution durable du nombre de cellules de Sertoli est aussi observée dans ces conditions alors que celle-ci n'est que transitoire lors d'une exposition fœtale (cf. précédemment, Auharek et coll., 2010). Borch et coll. (2004) décrivent également une diminution transitoire de la sécrétion d'inhibine B au moment de la puberté lors d'une exposition continue depuis la vie fœtale.

En résumé, les effets d'une exposition pendant la vie fœtale et postnatale semblent similaires à ceux décrits lors d'une exposition *in utero*, mais ces effets sont plus prononcés et certains plus durables. Il n'est pourtant pas évident que les mécanismes mis en jeu durant ces deux périodes soient identiques. La démonstration d'effets importants chez une espèce autre que le rat n'a pas été documentée.

Effets lors d'une exposition postnatale

Les effets d'une exposition aux phtalates pendant la période pubertaire (à partir de 21 jours) ont été étudiés chez le rat. Une exposition à 500 mg/kg de DBP induit rapidement chez le rat Sprague-Dawley la diminution de l'expression des enzymes de biosynthèse de la testostérone et de la testostéronémie dans les heures qui suivent le traitement (Alam et coll., 2010). Après 7 jours d'exposition quotidienne, le taux de testostérone des rats exposés est redevenu semblable à celui des rats témoins. Cet effet inhibiteur sur la stéroïdogenèse apparaît donc très temporaire. Dans la même étude, les auteurs observent

une augmentation de l'apoptose des spermatocytes au sein des tubes séminifères à la fois dans les heures suivant le début du traitement et après 7 jours. Cet effet sur la spermatogenèse semble donc plus durable. De manière intéressante, seul l'effet sur la spermatogenèse est bloqué par un antagoniste des œstrogènes. Les effets des phtalates sur la gamétogenèse et la stéroïdogenèse peuvent donc être dissociés. Une exposition sur une période plus longue de un à trois mois, augmente au contraire la synthèse de testostérone et les taux de LH (Akingbemi et coll., 2004). Cependant, la sécrétion de testostérone de chaque cellule de Leydig issue des animaux exposés et cultivée *in vitro* est diminuée que ce soit en condition basale ou stimulée par la LH. L'augmentation du taux de testostérone *in vivo* pourrait en fait être liée à une augmentation de la prolifération des cellules de Leydig adultes. Ces effets variables sur la stéroïdogenèse peuvent expliquer que certains auteurs n'observent aucun changement significatif des taux d'androgènes sur des périodes proches (Botelho et coll., 2009) tout en rapportant cependant une diminution du poids des vésicules séminales ou du muscle levator bulbo-caverneux, deux tissus androgéno-dépendants. La réduction du poids de ces organes s'accompagne fréquemment d'une diminution du poids de la prostate ventrale, des épididymes et des testicules durant la même période (Lee et coll., 2008 ; Noriega et coll., 2009). À partir de la puberté, les cellules de Sertoli ont définitivement cessé de proliférer et les variations de poids testiculaires reflètent essentiellement une atteinte germinale sans pour autant que celle-ci ait été recherchée par tous les auteurs.

Une étude menée par Noriega et coll. (2009) a comparé la sensibilité de deux lignées de rats, Sprague-Dawley et Long-Evans, au DEHP pendant la période pubertaire (22 à 98 jours). Très peu d'effets ont été observés aux doses de 10 ou 100 mg/kg/j. Dans ces travaux, à l'inverse de l'étude d'Akingbemi et coll. (2004), et pourtant bien qu'utilisant un protocole presque identique, à aucun moment la sécrétion de testostérone n'est apparue supérieure à celle des rats témoins. De 300 à 900 mg/kg/j les auteurs rapportent une diminution des taux de testostérone et une augmentation des taux de LH plasmatiques. Ces variations hormonales s'accompagnent d'une réduction du poids de tous les organes androgéno-dépendants. Chez le rat Long-Evans, l'âge de la séparation du prépuce, indicateur de la puberté, est nettement retardé. Chez le rat Sprague-Dawley spécifiquement, une diminution de poids testiculaire et épididymaire ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes sont notées. D'autres auteurs rapportent également une diminution du taux testostérone (Vo et coll., 2009b) et du poids des organes reproducteurs mâles.

En résumé, il semble que les effets de phtalates chez le rat pubère sur la sécrétion d'androgènes apparaissent très variables. À forte dose, il est probable qu'ils réduisent celle-ci diminuant de ce fait la croissance des organes reproducteurs mâles. Des différences liées à la lignée de rat employée existent : la lignée Sprague-Dawley semble plus sensible aux lésions testiculaires affectant la spermatogenèse.

Chez le lapin, Higuchi et coll. (2003) ont comparé les effets du DEHP pendant la période fœtale et la période pubertaire. Pendant cette seconde période, les effets néfastes apparaissent moindres bien que quelques tubules vides soient observés et qu'une augmentation des formes anormales de spermatozoïdes soit également décrite.

Chez l'adulte (plus de 60 jours), les effets des phtalates sur le testicule semblent peu prononcés à moins d'une exposition à de très fortes doses. Ainsi, Nair et coll. (2008) relatent que 1 000 mg/kg/j de DBP administrés durant 7 jours à des rats adultes diminuent le taux de testostérone plasmatique et la densité et la viabilité des spermatozoïdes. Dans cette étude, les protocoles sont peu détaillés rendant difficile l'appréciation de la méthodologie. Akingbemi et coll. (2001) n'observent aucun effet de doses allant de 1 à 200 mg/kg/j de DEHP sur les taux de testostérone du rat adulte. Chez le lapin adulte, des doses de 400 mg/kg/j de DEHP administrées pendant 12 semaines n'augmentent que très peu l'apparition de SCO et n'ont pas d'effet sur le nombre de spermatozoïdes (Higuchi et coll., 2003). En résumé, il semble donc que le testicule adulte de rat ou de lapin soit beaucoup moins sensible aux effets d'une exposition aux phtalates que le testicule fœtal ou postnatal.

Chez l'adulte, une étude intéressante a été menée avec des rats Sprague-Dawley castrés et supplémentés en testostérone artificiellement (Lee et Koo, 2007). Chez ces animaux, le DBP, le DEHP, le DINP, le DIDP et le MEHP diminuent le poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et des autres organes reproducteurs mâles. Des effets sont observés dès la dose de 20 mg/kg/j. En revanche le di-n-heptyl-phtalate (DnHP) et le BBP semblent inefficaces dans ce modèle. Cette étude est remarquable car elle décrit un effet anti-androgénique des phtalates indépendant de l'inhibition de la synthèse de testostérone testiculaire. Les phtalates pourraient donc agir directement sur le tractus reproducteur mâle indépendamment de leur effet sur la stéroïdogenèse testiculaire et inhiber la croissance androgéno-dépendante de celui-ci.

Une étude propose que l'hypothyroïdisme puisse protéger en partie des effets du DBP (Lee et coll., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des rats adultes rendus hypothyroïdiens par l'injection de propylthiouracyle (PTU) puis exposés à 500 mg/kg/j de DBP. Chez les rats PTU, une forte diminution de la métabolisation du DBP en MBP est observée (de près de la moitié). Notons cependant qu'une réduction de poids testiculaire est observée aussi bien chez les rats normaux et hypothyroïdiens (PTU) en réponse au DBP. Il est donc difficile d'être certain que l'hypothyroïdisme protège le testicule des effets néfastes du DBP mais l'effet sur le métabolisme de ce phtalate apparaît clair.

Enfin, Voss et coll. (2005) ont exposé des rats adultes à des doses allant de 30 à 300 mg/kg/j de DEHP depuis l'âge de 110 jours jusqu'à leur mort. La mort de la plupart des rats se produit entre 750 et 1 200 jours. Le DEHP (300 mg/kg/j) ne modifie pas la durée de vie des animaux mais augmente subtilement l'apparition de tumeurs de cellules de Leydig. Le testicule pourrait donc être

une cible de la carcinogénicité du DEHP au même titre que le foie. Les effets décrits apparaissent cependant modestes et sont rapportés uniquement chez les animaux moribonds du fait du protocole choisi.

Études chez les primates non humains

Quelques études, ayant pour objectif la recherche des effets des phtalates, ont été réalisées chez des primates non humains (tableau 35.III). Le singe marmouset (*Callithrix jacchus*) est un bon modèle en termes de période du développement (Kelnar et coll., 2002), de la différenciation périnatale des cellules germinales (Mitchell et coll., 2008), de l'organisation et de l'efficience de la spermatogenèse (Millar et coll., 2000 ; Sharpe et coll., 2000).

En 1998, Kurata et coll. ont étudié l'effet d'une exposition de marmousets âgés de 12-15 mois au DEHP à des doses de 100, 500, 2 500 mg/kg/j durant 13 semaines. Une observation macroscopique et microscopique de très nombreux organes et des dosages sanguins (cholecystokinine, testostérone et œstradiol) sont réalisés, ainsi que l'analyse du zinc testiculaire, la morphométrie des peroxysomes hépatiques et leur activité enzymatique.

Une réduction du poids de la rate est observée chez les mâles sous DEHP avec un effet dose mais cela ne s'accompagnant pas de modification histologique, les auteurs ne la considèrent pas comme pathologique et ce d'autant que le poids des rates du groupe témoin semble plus élevé qu'habituellement. Une augmentation de 1,3 à 1,4 fois est notée pour le volume moyen des peroxysomes chez les animaux traités par du DEHP comparé aux témoins. Par ailleurs, l'activité cytochrome P450 semble augmenter dans les groupes DEHP. Il n'y a pas de modification des organes génitaux, du taux de testostérone ou d'œstradiol ni du zinc testiculaire.

Les auteurs concluent à l'absence d'effet toxique du DEHP chez le singe marmouset contrairement aux effets mis en évidence chez les rongeurs et soulignent que l'induction de certains enzymes participerait au métabolisme du DEHP chez le singe.

Ito et coll. (2005) ont analysé les différences dans le métabolisme des phtalates entre la souris, le rat et le marmouset en étudiant l'activité de la lipase, de l'UDP-glucoronyltransférase, de l'alcool déshydrogénase et de l'aldéhyde déshydrogénase dans plusieurs organes.

La lipase qui forme le MEHP à partir du DEHP présente l'activité la plus forte chez la souris (150 à 350 fois plus chez la souris que chez le marmouset et la plus basse chez le marmouset). L'activité de l'alcool et de l'aldéhyde déshydrogénase semble plus élevée chez le marmouset que chez la souris ou le rat. Ces différences dans le métabolisme du DEHP entre les espèces pourraient expliquer l'effet plus important du DEHP chez les rongeurs.

L'étude de Ito et coll. (2007) met en évidence après administration de DEHP une concentration hépatique de MEHP significativement plus élevée chez le

rat et la souris comparé au marmouset. L'administration du DEHP induit l'expression d'enzyme des peroxysomes hépatiques chez la souris, le rat, mais pas chez le marmouset. Ces différences témoignent d'un métabolisme différent suivant l'espèce.

Concernant les effets des phtalates sur l'appareil reproducteur des primates non humains, les études ne montrent pas d'effets ou des effets moins importants que ceux retrouvés chez les rongeurs.

Tomonari et coll. (2006) ont administré à des marmousets juvéniles mâles et femelles (environ 18 mois, sexuellement matures) 100, 500, 2 500 mg/kg/j de DEHP durant 3 mois. Les concentrations plasmatiques de testostérone, d'œstradiol et de zinc testiculaire ont été évaluées. Par ailleurs, les analyses macroscopiques et microscopiques ont été effectuées sur les organes de l'appareil reproducteur comprenant également la concentration de spermatozoïdes chez le mâle et l'activité de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase. Aucune conséquence significative de l'administration de DEHP durant 3 mois n'a été mise en évidence chez les mâles, à l'exception d'une diminution du zinc testiculaire et de la gluthation-transférase testiculaire aux doses de 100 et 500 mg/kg/j mais non à 2 500 mg/kg/j.

Hallmark et coll. (2007) ont étudié l'effet du DBP et du MBP sur la production de testostérone et les cellules de Leydig *in vitro* dans le testicule de rat et d'homme, et *in vivo* chez le rat fœtal et le nouveau-né marmouset. Ils retrouvent un effet du DBP et MBP administré chez le marmouset nouveau-né se traduisant par une altération de la stéroïdogenèse leydigienne (hyperplasie/hypertrophie des cellules de Leydig) compensée probablement par la LH. Cet effet va dans le même sens que les effets obtenus sur le testicule fœtal lorsque la rate gestante est traitée par le DBP.

Le même groupe (Mc Kinell et coll., 2009) a exposé des femelles marmouset gestantes à 500 mg/kg/j de MBP entre la 7e et la 15e semaine de gestation, période durant laquelle se mettent en place les tubes séminifères et débute la sécrétion de testostérone ; 6 mâles sont autopsiés à la naissance, 5 durant la vie adulte (18-21 mois). Par ailleurs dans un deuxième protocole, ils exposeront des nouveau-nés (4e jour) à 500 mg/kg/j durant 14 jours. Les testicules sont examinés macroscopiquement mais également par immunohistochimie afin d'apprécier l'index de maturation des cellules germinales. L'exposition *in utero* n'a pas de conséquence notable sur les différents paramètres analysés à la naissance ou à l'âge adulte. Le taux de testostérone plasmatique est similaire entre exposés et témoins. L'analyse immunohistochimique met en évidence à la naissance chez les animaux traités des groupements inhabituels de cellules germinales chez les exposés, cellules germinales marquées principalement par OCT4, AP2δ et c-KIT indiquant des gonocytes non différenciés. De telles agrégations cellulaires ont pu être retrouvées dans les tubes séminifères fœtaux de rat exposés au DBP. L'exposition des marmousets nouveau-nés au MBP se traduit par une réponse relativement hétérogène au niveau des

cellules germinales. Enfin, les résultats des animaux exposés *in utero* ne mettent pas en évidence de changement à l'âge adulte.

Les auteurs concluent à une absence d'effet de l'exposition au MBP *in utero* sur le développement et la fonction testiculaire. Les effets notés sur les cellules germinales n'apparaissent pas significatifs étant donné l'hétérogénéité des réponses.

Enfin, chez les singes *Cynomolgus* l'étude de l'exposition d'animaux adultes au DEHP ou au DINP durant 14 jours à la dose de 500 mg/kg/j ne met pas en évidence d'effets sur les différents organes étudiés dont le testicule (Pugh et coll., 2000). Dans cette étude, aucun marqueur de la prolifération des peroxysomes n'est modifié par les phtalates administrés.

Tableau 35.III : Études chez le primate non humain

Référence	Primate non humain	Période d'exposition et durée	Phtalates/ Exposition mg/kg/j	Critères étudiés	Effets significatifs
Kurata et coll., 1998	Marmouset mâle et femelle	Âge 12-15 mois 13 semaines	DEHP : 100, 500, 2 500	Constantes hépatique et du métabolisme Cholecystokinine Testostérone Œstradiol Zinc testiculaire Évaluation macroscopie et microscopie de plusieurs organes Activité des peroxysomes cytochrome P450	Surface moyenne peroxysome hépatique x1,3
Tomonari et coll., 2006	Marmouset mâle et femelle	Adulte juvénile (18 mois) 3 mois	DEHP : 100, 500, 2 500	Testostérone Œstradiol Zinc testiculaire Activités enzymatiques Évaluation macroscopie et microscopie des testicules et ovaires	Mâle : ↓ zinc testiculaire et de la glutathion transférase à 100 et 500 mg/kg/j Femelle : ↑ volume ovaire et utérus, ↑ œstradiol
Hallmark et coll., 2007	Marmouset 4 paires de jumeaux	4e jour postnatal 14 jours	MBP 500	Testostérone plasmatique Microscopie cellules Leydig	↑ du volume des cellules de Leydig
	Marmouset n=4	4-6 jours postnatal 14 jours	DBP 500		↑ du volume des cellules de Leydig (non significative)
	Marmouset n=9	2-7 jours postnatal	MBP 500	Testostérone plasmatique 5 h après traitement	↓ testostérone plasmatique

Référence	Primate non humain	Période d'exposition et durée	Phtalates/ Exposition mg/kg/j	Critères étudiés	Effets significatifs
McKinnel et coll., 2009	Marmouset femelle gravide	7-15 jours de gravidité 7 semaines	MBP 500	Organes génitaux Évaluation macroscopique et microscopique des testicules Testostérone plasmatique	Groupes de gonocytes indifférenciés chez le nouveau-né
	Marmouset nouveau-né	4e jour 14 jours	MBP 500	Cellules germinales Immunohistochimie	Pas d'effet Réponse hétérogène
Pugh et coll., 2000	Cynomolgus (*macaca fascicularis*)	2 ans 14 jours	DINP MBP : 500	Observations plusieurs organes	Pas d'effet sur testicule
			DEHP MBP : 500	Paramètres métaboliques et hématologiques Peroxysome Bêta-oxydation Synthèse ADN	↑ des neutrophiles et ↓ des lymphocytes sanguins

Comparaison des effets testiculaires chez le rat et le primate non humain

La figure 35.1 résume les effets testiculaires rapportés dans ce chapitre chez le rat et le primate non humain. Les protocoles des études mises en place chez le rat et les primates sont sensiblement différents et peu de points de concordance ont été rapportés. Chez le primate nouveau-né, une seule étude retrouve un effet des phtalates sur les cellules de Leydig (Hallmark et coll., 2007), principale altération décrite chez le rat, hyperplasie leydigienne et inhibition de la stéroïdogenèse mais cette réponse apparaît très hétérogène et n'est pas retrouvée dans d'autres études (Mc Kinnel et coll., 2009). De même que chez le rat, un retard de différenciation des cellules germinales fœtales a également été rapporté chez le marmouset, cependant cet effet apparaît également peu significatif. Il n'y a pas d'effet notable sur le tractus reproducteur mâle décrit chez le marmouset alors que la croissance de nombreux organes de celui-ci est altérée chez le rat. Aucun effet notable sur la prolifération des cellules de Sertoli n'est décrit chez les primates, sans qu'il soit évident que ce paramètre ait été étudié dans le détail, comme il l'a été chez le rat. Chez le primate juvénile et adulte, il n'est pas rapporté d'effet testiculaire mais les observations se limitent souvent au niveau macroscopique. De plus, cette période apparaît également comme moins sensible chez le rat. Dans l'ensemble, il est probable que la meilleure connaissance du développement testiculaire du rat facilite la mise en évidence de manière détaillée des effets des phtalates car ceux-ci sont étroitement dépendants du stade de développement. Les deux études qui ont abordé cette question chez les primates ne rapportent que peu d'effets

similaires à ceux décrits chez le rat mais apparaissent insuffisantes pour pouvoir conclure définitivement à l'absence d'effet identique.

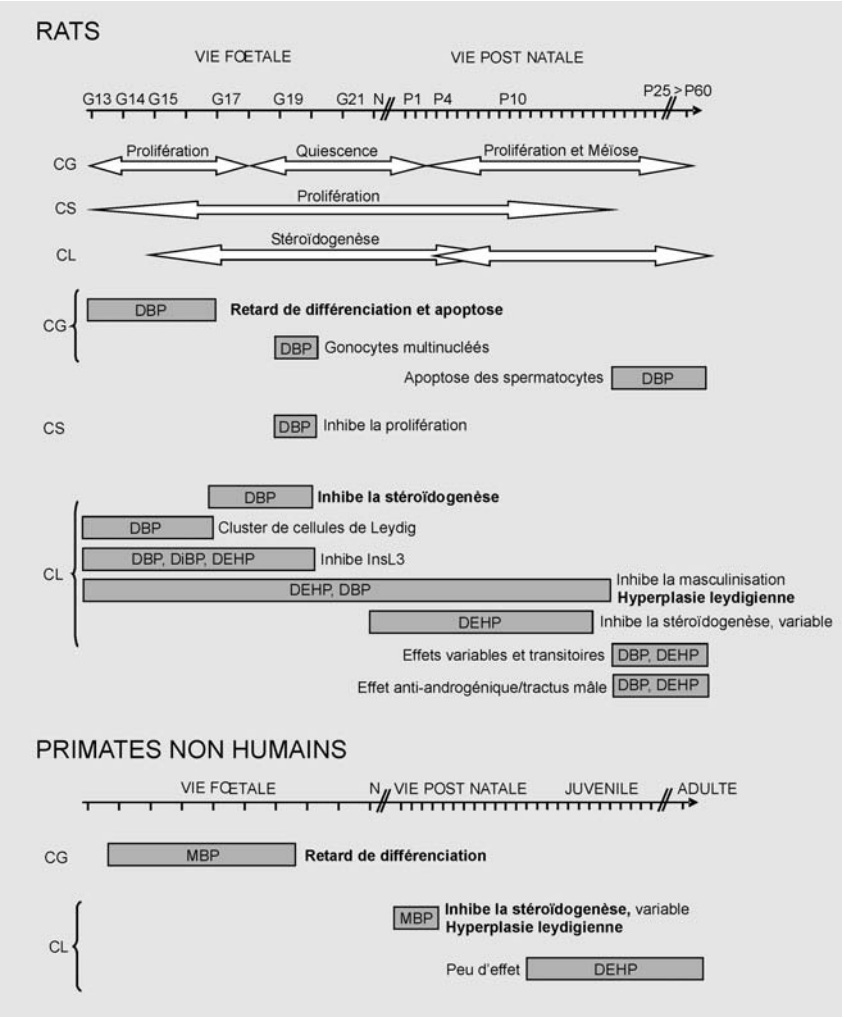


Figure 35.1 : Comparaison des effets chez le rat et le primate

Les périodes minimales d'exposition sont proposées en grisé lorsque les données étaient disponibles. Les principaux phtalates impliqués sont indiqués dans les rectangles gris. Les effets retrouvés chez différentes espèces sont indiqués en gras. Les effets sont décomposés selon les types cellulaires affectés : CG, cellules germinales ; CS, cellules de Sertoli ; CL, cellules de Leydig. Deux populations distinctes de CL fœtales et adultes vont se succéder au cours du développement testiculaires (indiquées par deux doubles flèches chevauchantes).

En conclusion, deux périodes apparaissent présenter une sensibilité particulière aux phtalates : la période fœtale, la plus sensible, et la période postnatale et pubertaire. Durant ces périodes, les phtalates inhibent la fonction de gamétogenèse et de stéroïdogenèse mâle chez le rat. Des effets sont rapportés pour des expositions de l'ordre de la dizaine ou centaine de mg/kg/j, selon les études. L'inhibition de la synthèse de testostérone est bien décrite chez le rat mais ne semble pas exister chez la souris. Les conséquences de celle-ci sont des malformations ou un défaut de développement de l'appareil reproducteur mâle (cryptorchidisme, hypospadias, diminution marquée de la distance anogénitale...). Il est probable que les phtalates puissent exercer également un effet anti-androgénique directement au niveau des organes reproducteurs et indépendamment du testicule. Plusieurs atteintes ont été décrites sur la fonction de gamétogenèse et les cellules germinales. Ces lésions testiculaires sont indépendantes de l'effet sur la stéroïdogenèse. Des études additionnelles seront nécessaires pour définir si les phtalates agissent directement sur les cellules germinales ou via les cellules de Sertoli. Enfin, l'altération du nombre ou de la viabilité des spermatozoïdes parfois rapportée pourrait avoir des conséquences plus drastiques dans l'espèce humaine chez laquelle ces gamètes sont moins robustes que chez les rongeurs. Un paramètre important à prendre en compte dans de futures études sera l'identification de facteurs génétiques de susceptibilité. Cela nécessitera sans nul doute une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu, notamment par le biais d'animaux transgéniques.

Les études chez les primates non humains ne semblent pas montrer d'effet net de l'exposition à certains phtalates sur l'appareil de reproduction contrairement aux effets retrouvés chez les rongeurs. Cependant, deux études montrent des effets semblables à ceux observés chez les rongeurs lorsque la période d'exposition concerne la période *in utero* ou les premiers jours de vie.

La question se pose de savoir si les rongeurs sont de bons modèles animaux pour l'étude des effets chez l'homme. Il y a indubitablement des différences de métabolisme et de physiologie à prendre en compte pour les différentes espèces mais sans connaître les effets sur les cellules humaines correspondant aux types et stades les plus sensibles chez rongeurs, il est difficile de se prononcer.

Bibliographie

AKINGBEMI BT, YOUKER RT, SOTTAS CM, GE R, KATZ E, et coll. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2001, **65** : 1252-1259

AKINGBEMI BT, GE R, KLINEFELTER GR, ZIRKIN BR, HARDY MP. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci* USA 2004, **101** : 775-780

ALAM MS, OHSAKO S, MATSUWAKI T, ZHU XB, TSUNEKAWA N, et coll. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis : a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 2010, **139** : 427-437

AUHAREK SA, DE FRANCA LR, MCKINNELL C, JOBLING MS, SCOTT HM, SHARPE RM. Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 2010, **151** : 2868-2875

BOBERG J, METZDORFF S, WORTZIGER R, AXELSTAD M, BROKKEN L, et coll. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 2008, **250** : 75-81

BOEKELHEIDE K, KLEYMENOVA E, LIU K, SWANSON C, GAIDO KW. Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc Res Tech* 2009, **72** : 629-638

BORCH J, LADEFOGED O, HASS U, VINGGAARD AM Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol* 2004, **18** : 53-61

BORCH J, DALGAARD M, LADEFOGED O. Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA-apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol* 2005, **19** : 517-525

BOTELHO GG, GOLIN M, BUFALO AC, MORAIS RN, DALSENTER PR, MARTINO-ANDRADE AJ. Reproductive effects of di(2-ethylhexyl)phthalate in immature male rats and its relation to cholesterol, testosterone, and thyroxin levels. *Arch Environ Contam Toxicol* 2009, **57** : 777-784

CULTY M, THUILLIER R, LI W, WANG Y, MARTINEZ-ARGUELLES DB, et coll. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod* 2008, **78** : 1018-1028

DAVID RM, MOORE MR, FINNEYDC, GUEST D. Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000, **55** : 433-443

DRAKE AJ, VAN DEN DRIESCHE S, SCOTT HM, HUTCHISON GR, SECKL JR, et coll. Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology* 2009, **150** : 5055-5064

EMA M, MIYAWAKI E. Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reprod Toxicol* 2001, **15** : 189-194

FERRARA D, HALLMARK N, SCOTT H, BROWN R, MCKINNELL C, et coll. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006, **147** : 5352-5362

FISHER JS, MACPHERSON S, MARCHETTI N, SHARPE RM. Human testicular dysgenesis syndrome : a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003, **18** : 1383-1394

GAIDO KW, HENSLEY JB, LIU D, WALLACE DG, BORGHOFF S, et coll. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007, **97** : 491-503

GRAY LE, JR., OSTBY J, FURR J, PRICE M, VEERAMACHANENI DN, et coll. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000, **58** : 350-365

GRAY LE, JR., BARLOW NJ, HOWDESHELL KL, OSTBY JS, FURR JR, et coll. Transgenerational effects of di (2-ethylhexyl) phthalate in the male crl : cd(sd) rat : added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicol Sci* 2009, **110** : 411-425

HALLMARK N, WALKER M, MCKINNELL C, MAHOOD IK, SCOTT H, et coll. Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat : comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 390-396

HIGUCHI TT, PALMER JS, GRAY LE, JR., VEERAMACHANENI DN. Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 2003, **72** : 301-313

HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, RIDER CV, WILSON VS, et coll. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development : altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol Sci* 2007, **99** : 190-202

HOWDESHELL KL, RIDER CV, WILSON VS, GRAY LE JR Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res* 2008, **108** : 168-76

ITO Y, YOKOTA H, WANG R, YAMANOSHITA O, ICHIHARA G, et coll. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol* 2005, **79** : 147-154

ITO Y, YAMANOSHITA O, KURATA Y, KAMIJIMA M, AOYAMA T, et coll. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-related enzymes by di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) treatment in mice and rats, but not marmosets. *Arch Toxicol* 2007, **81** : 219-226

JOHNSON KJ, MCCAHAN SM, SI X, CAMPION L, HERRMANN R, et coll. The orl rat with inherited cryptorchidism has increased susceptibility to the testicular effects of in utero dibutyl phthalate exposure. *Toxicol Sci* 2008, **105** : 360-367

KELNAR CJ, MCKINNELL C, WALKER M, MORRIS KD, WALLACE WH, et coll. Testicular changes during infantile 'quiescence' in the marmoset and their gonadotrophin dependence : a model for investigating susceptibility of the prepubertal human testis to cancer therapy? *Hum Reprod* 2002, **17** : 1367-1378

KURATA Y, KIDACHI F, YOKOYAMA M, TOYOTA N, TSUCHITANI M, et coll. Subchronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets : lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol Sci* 1998, **42** : 49-56

LEE BM, KOO HJ. Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2007, **70** : 1365-1370

LEE KY, SHIBUTANI M, TAKAGI H, KATO N, TAKIGAMI S, et coll. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 2004, **203** : 221-238

LEE E, KIM HJ, IM JY, KIM J, PARK H, et coll. Hypothyroidism protects di(n-butyl) phthalate-induced reproductive organs damage in Sprague-Dawley male rats. *J Toxicol Sci* 2008, **33** : 299-306

LIN H, GE RS, CHEN GR, HU GX, DONG L, et coll. Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci* USA 2008, **105** : 7218-7222

LIN H, LIAN QQ, HU GX, JIN Y, ZHANG Y, et coll. In utero and lactational exposures to diethylhexyl-phthalate affect two populations of Leydig cells in male Long-Evans rats. *Biol Reprod* 2009, **80** : 882-888

MACLEOD DJ, SHARPE RM, WELSH M, FISKEN M, SCOTT HM, et coll. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl* 2010, **33** : 279-287

MAHOOD IK, SCOTT HM, BROWN R, HALLMARK N, WALKER M, SHARPERM. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis : comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 55-61

MARTINO-ANDRADE AJ, MORAIS RN, BOTELHO GG, MULLER G, GRANDE SW, et coll. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. *Int J Androl* 2009, **32** : 704-712

MCKINNELL C, MITCHELL RT, WALKER M, MORRIS K, KELNAR CJ, et coll. Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod*2009, **24** : 2244-2254

MILLAR MR, SHARPE RM, WEINBAUER GF, FRASER HM, SAUNDERS PT. Marmoset spermatogenesis : organizational similarities to the human. *Int J Androl* 2000, **23** : 266-277

MITCHELL RT, COWAN G, MORRIS KD, ANDERSON RA, FRASER HM, et coll. Germ cell differentiation in the marmoset (Callithrix jacchus) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Hum Reprod* 2008, **23** : 2755-2765

NAIR N, BEDWAL S, KUMARI D, BEDWAL S, BEDWAL RS. Effect on histological and sperm kinetics in DBP exposed Wistar rats. *J Environ Biol* 2008, **29** : 769-772

NORIEGA NC, HOWDESHELL KL, FURR J, LAMBRIGHT CR, WILSON VS, GRAY LE JR. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 163-178

PUGH G, JR., ISENBERG JS, KAMENDULIS LM, ACKLEY DC, CLARE LJ, et coll. Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2000, **56** : 181-188

SAILLENFAIT AM, SABATE JP, GALLISSOT F. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol* 2008, **26** : 107-115

SAILLENFAIT AM, SABATE JP, GALLISSOT F. Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol*2009, **28** : 468-476

SCARANO WR, TOLEDO FC, GUERRA MT, DE CAMPOS SG, JUNIOR LA, et coll. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate :

proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology* 2009, **262** : 215-223

SCOTT HM, HUTCHISON GR, JOBLING MS, MCKINNELL C, DRAKE AJ, et coll. Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 2008, **149** : 5280-5287

SHARPE RM, WALKER M, MILLAR MR, ATANASSOVA N, MORRIS K, et coll. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on sertoli cell number and testicular development in the marmoset : comparison with the rat. *Biol Repro* 2000, **62** : 1685-1693

STROHEKER T, REGNIER JF, LASSURGUERE J, CHAGNON MC. Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate : distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006, **44** : 2064-2069

STRUVE MF, GAIDO KW, HENSLEY JB, LEHMANN KP, ROSS SM, et coll. Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2009, **86** : 345-354

TOMONARI Y, KURATA Y, DAVID RM, GANS G, KAWASUSO T, et coll. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets : I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study. *J Toxicol Environ Health A* 2006, **69** : 1651-1672

VO TT, JUNG EM, DANG VH, JUNG K, BAEK J, et coll. Differential Effects of Flutamide and Di-(2-ethylhexyl) phthalate on Male Reproductive Organs in a Rat Model. *J Reprod Dev* 2009a, **55** : 400-411

VO TT, JUNG EM, DANG VH, YOO YM, CHOI KC, et coll. Di-(2 ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2009b, **7** : 104

VOSS C, ZERBAN H, BANNASCH P, BERGER MR. Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2005, **206** : 359-371

WANG X, SHANG L, WANG J, WU N, WANG S. Effect of phthalate esters on the secretion of prostaglandins (F2alpha and E2) and oxytocin in cultured bovine ovarian and endometrial cells. *Domest Anim Endocrinol* 2010, **39** : 131-136

WELSH M, SHARPE RM, WALKER M, SMITH LB, SAUNDERS PT. New insights into the role of androgens in wolffian duct stabilization in male and female rodents. *Endocrinology* 2009, **150** : 2472-2480

WOLFE, GW, LAYTONKA. Multigeneration reproduction toxicity study in rats : multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TRC Study No. 7244-200. 2003. TherImmune Research Corporation, Gaithersbury, Maryland

YAMASAKI K, OKUDA H, TAKEUCHI T, MINOBE Y. Effects of in utero through lactational exposure to dicyclohexyl phthalate and p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 2009, **189** : 14-20

ZHU YJ, JIANG JT, MA L, ZHANG J, HONG Y, et coll. Molecular and toxicologic research in newborn hypospadiac male rats following in utero exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology* 2009, **260** : 120-125

36
Études chez les animaux femelles

La plupart des études ont été menées chez les rongeurs et seule une publication relate des travaux conduits chez un primate non humain, le singe marmouset. Les études effectuées à des doses faibles sont peu nombreuses.

Étude toxicologique de référence pour la détermination de la DJT

L'étude toxicologique du DBP (di-*n*-butyl phtalate) chez le rat CD (SD) IGS, menée par Lee et coll. (2004), est fondée sur des pesées d'organes après autopsie des mères et des jeunes à différents âges et des analyses immunohistologiques. Elle rapporte peu d'effets sur les descendants femelles, et uniquement à fortes doses. Dans cette étude, des rates CD (SD) IGS sont exposées à des concentrations journalières de DBP (0, 20, 200, 2 000, et 10 000 mg/kg de nourriture) du jour 15 de gestation jusqu'au sevrage au jour 21 postnatal. Les descendants sont analysés au jour 21 puis à 11 et 20 semaines post sevrage. Parmi tous les paramètres analysés, on observe dans les hypophyses des descendantes femelles (21 jours après la naissance), une diminution du pourcentage de cellules FSH et prolactine positives à la dose de 10 000 mg/kg de DBP (Lee et coll., 2004). Une tendance à un retard de l'âge à la puberté est mentionnée bien que non significative. Il ressort de cette analyse que le seul effet à long terme observé chez les descendantes est une diminution du poids de l'hypophyse lorsque les mères ont été exposées à de fortes doses (10 000 mg/kg de nourriture).

Exposition *in utero* et pendant la lactation

Afin d'évaluer les effets potentiellement néfastes des phtalates au cours du développement, plusieurs études menées chez les rongeurs ont soumis les mères à des doses faibles (ou fortes) pendant la gestation, ou chez le jeune jusqu'au sevrage, ou les deux.

Une étude a été publiée en 2007 sur l'effet de faibles (0,015 ; 0,045 ; 0,135 ; 0,405 et 1,215 mg/kg de poids corporel/jour) et fortes (5 ; 15 ; 45 ; 135 et

405 mg/kg/jour) doses de DEHP chez les rates Wistar exposées par gavage du jour 6 de gestation au jour 21 postnatal (sevrage). Quelle que soit la dose, aucun effet n'est observable sur le poids des différents organes analysés (foie, rein, rate, thymus, thyroïde, ovaire et utérus). Les descendantes femelles présentaient une cyclicité normale sans altération des profils hormonaux (œstradiol et progestérone). La seule différence avec les témoins concerne le nombre de follicules tertiaires atrétiques présents dans les ovaires des descendantes exposées à la plus forte dose (405 mg/kg/jour). L'utérus et le vagin ne présentaient pas d'altérations histologiques (Grande et coll., 2007).

La même équipe avait également montré en 2006, que l'activité aromatase mesurée sur des coupes de cerveau dans l'aire préoptique de l'hypothalamus de descendants mâles et femelles était modifiée. Cependant, il est à noter que le profil de réponse varie avec la dose, le sexe et l'âge étudié (1 ou 22 jours postnatals). Par exemple au jour 22, l'activité aromatase est plus affectée chez la femelle que chez le mâle alors que c'est l'inverse au jour 1. Ces résultats rappellent que les mâles et les femelles répondent différemment au DEHP, non seulement en fonction de l'âge mais également en fonction des doses (Andrade et coll., 2006).

Enfin, cette équipe a montré l'existence d'un délai de 2 jours dans l'âge à la puberté (mesuré par l'ouverture vaginale) chez les femelles exposées à 15 mg DEHP/kg/j et au-dessus ainsi qu'une tendance au retard pour l'âge du premier œstrus lors d'exposition à 135 et 405 mg DEHP/kg/j (approximativement 2 jours) (Grande et coll., 2006).

Une étude récente a évalué les effets d'une exposition par gavage à 100 mg/kg/j de DBP du jour 12 de gestation au jour 21 postnatal sur des rates Wistar. Elle montre qu'à cette dose il n'y a pas d'effet sur l'âge à la puberté. L'histologie des ovaires et utérus ne montre aucune différence significative entre les animaux traités et les témoins (Guerra et coll., 2010).

Ces résultats sont différents de ceux publiés en 2004 sur des rats Long-Evans exposés au DBP aux doses de 12 et 50 mg/kg/j pendant 2,5 mois avant l'accouplement et pendant toute la gestation et lactation puis jusqu'à l'âge de 12 semaines des descendants. Dans cette étude, il avait été montré un retard de l'ouverture vaginale et de l'apparition du premier œstrus (Salazar et coll., 2004). Mais là encore, les lignées de rats, les durées d'administration et les doses diffèrent entre les études ce qui rend leurs résultats difficilement comparables.

En 2009, une équipe japonaise a utilisé des rats Sprague-Dawley ayant reçu oralement 300, 1 000, et 3 000 mg/kg/j de DEHP, deux semaines avant l'accouplement jusqu'au jour 7 de gestation pour évaluer l'histologie des ovaires et l'effet sur la fertilité et le début du développement. Ils ont montré que seule la forte dose de 3 000 mg/kg/j induisait un retard à concevoir. Les doses inférieures n'entraînent aucun effet sur la fertilité ou le développement

embryonnaire. Les ovaires présentent une augmentation du nombre des gros follicules atrétiques à partir des doses de 1 000 mg/kg/j (Takai et coll., 2009).

Enfin, on peut mentionner une étude visant à déterminer les effets du di-2-éthylhexyl-terephtalate (DEHT) chez le rat et la souris et qui ne mentionne aucun effet clinique après autopsie des descendants à l'exception d'une augmentation du poids du foie chez les rates et les souris dont les mères ont été exposées à de fortes doses (Faber et coll., 2007).

En résumé, l'âge à la puberté semble le paramètre physiologique le plus fréquemment perturbé. Cependant, la modification peut être une avancée ou un retard sans que l'on puisse trouver une explication cohérente à cela au vue des protocoles utilisés. Au niveau ovarien, peu d'effets si ce n'est une augmentation du nombre de follicules pré-ovulatoires en atrésie observée pour les doses d'exposition les plus fortes.

Exposition postnatale

Les études concernent le rat, la souris et le marmouset après exposition au DBP, MEHP et BBP.

Chez les rongeurs

Chez le rat femelle Long-Evans, l'exposition par gavage à 250, 500 et 1 000 mg/kg/j de DBP depuis le sevrage (21 jours postnatals) jusqu'à l'âge adulte, induit une réduction de la fertilité de ces animaux (Gray et coll., 2006). Le pourcentage de femelles donnant naissance à des petits vivants est réduit de plus de 50 % à 500 mg/kg/j et de 90 % à 1 000 mg/kg/j. Les autres paramètres mesurés comme l'âge de l'ouverture vaginale et du premier œstrus, la cyclicité et l'indice de conception (nombre de femelles saillies/ nombre de femelles accouplées et nombre de femelles gestantes/nombre de femelles saillies) ne sont pas significativement affectés par l'exposition au DBP. Les dosages de progestérone dans le sérum des femelles en gestation ainsi que ceux des hormones produites par les ovaires des femelles au 13e jour de gestation révèlent une altération fonctionnelle du corps jaune et de la synthèse de progestérone. Ceci est en accord avec la présence de corps jaunes hémorragiques sur les ovaires. Il est fait l'hypothèse que l'administration de 500 et 1 000 mg/kg/j à des rats femelles entraîne une production insuffisante de progestérone ovarienne à la mi-gestation pour maintenir une gestation pendant cette phase critique.

L'effet de l'exposition postnatale au BBP a été analysé chez le rat par administration de 500 mg/kg/j aux mères en lactation du jour 2 à 20 postnatal. L'effet sur les descendants a été étudié à différents stades de développement (21, 35, 50 et 100 jours postnatals). Il a été observé une augmentation du poids de

l'utérus au jour 21 qui ne se retrouve pas au-delà de ce stade. Cette étude longitudinale montre également des résultats intéressants concernant l'étude du transcriptome des glandes mammaires. En effet, à 21 jours, juste après l'exposition au BBP via le lait maternel, le nombre de gènes dérégulés dans ce tissu est de 516, puis il est de 39 à 50 jours et enfin de 3 à 100 jours. Cette analyse montre que les altérations ne sont pas forcément permanentes, que les réponses peuvent évoluer avec le temps et qu'il est toujours intéressant d'étudier les effets à court et long terme (Moral et coll., 2007).

Enfin, il convient de citer la seule étude ayant analysé les effets du DEHP administré à des rates Wistar-Imamichi par inhalation (doses de 0, 5 et 25 mg/m^3) 6 h/jour, 5 jours/semaine du jour 22 aux jours 41 et 84 postnatal. La fonction de reproduction des femelles a été évaluée en observant la survenue de la puberté (ouverture vaginale) et du premier cycle œstrien, puis la cyclicité a été observée du jour 49 à 84. Dans ces expériences, l'exposition au DEHP avance l'âge de l'ouverture vaginale et du 1er cycle, et les niveaux sériques de cholestérol, hormone lutéinisante (LH), et d'œstradiol sont significativement plus élevés pour les animaux traités avec 25 mg/m^3 de DEHP. Des cycles irréguliers sont observés plus fréquemment chez les rates exposées au DEHP, et l'analyse de l'expression de l'aromatase (enzyme qui synthétise l'œstradiol à partir de la testostérone) par RT-PCR a montré que le niveau d'ARNm de cette enzyme, est plus élevé dans le groupe d'animaux soumis à 25 mg/m^3 de DEHP. Ces résultats suggèrent que le DEHP inhalé peut perturber la fonction de reproduction des femelles en avançant le début de la puberté et en modifiant les équilibres hormonaux (Ma et coll., 2006).

Il faut signaler que d'autres études ont recherché les effets potentiels sur le développement. L'effet potentiel des phtalates sur le développement embryonnaire a été testé par l'administration de deux molécules, le di-n-hexylphtalate (DnHP) et le dicyclohexyl-phtalate (DCHP) aux doses de 250, 500 et 750 mg/kg/j, à des rates Sprague-Dawley du jour 6 au jour 20 de gestation. Il a été rapporté une importante mortalité embryonnaire à 750 mg/kg/j et une diminution significative du poids des fœtus portés par des mères ayant reçu 500 et 750 mg/kg/j. Le DCHP produit un retard de croissance fœtale à 750 mg/kg/j (Saillenfait et coll., 2009). Les mêmes auteurs ont également montré que le poids corporel des fœtus était significativement réduit lorsque les mères étaient traitées avec 200 et 250 mg/kg/j de diallylphtalate (DAP) (Saillenfait et coll., 2008).

D'après ces différentes études, quelques paramètres phénotypiques sont affectés par le DEHP et le DBP (tableaux 36.I et 36.II)

Tableau 36.I : Paramètres phénotypiques affectés dans les études avec le DEHP

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids ovaires, poids utérus	Marmouset	500-2 500 3 mois-18 mois	Tomonari et coll., 2006
Modification des follicules	Rate Sprague-Dawley Rate Wistar	400-1 000 Gestation/postnatal	Takai et coll., 2009 Grande et coll., 2007
Puberté Ouverture vaginale	Rate Wistar	Inhalation: 5-25 mg/m^3 Gavage : 15 Gestation/postnatal	Ma et coll., 2006 Grande et coll., 2006
Altérations des taux hormonaux Œstradiol progestérone,	Marmouset Rate Wistar	Orale : 100-2 500 Inhalation : 5-25 mg/m^3 Postnatal	Tomonari et coll., 2006 Ma et coll., 2006

Tableau 36.II : Paramètres phénotypiques affectés dans les études avec le DBP

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Doses (mg/kg)/Périodes	Références
Puberté Ouverture vaginale	Rate Long-Evans	Gavage : 12-50 Gestation/postnatal	Salazar et coll., 2004
Altérations des taux hormonaux Progestérone	Rate Long-Evans	500-1 000 Postnatal-âge adulte	Gray et coll., 2006

Chez le marmouset

Les femelles marmouset ont été exposées au DEHP juste après le sevrage (3 mois) et jusqu'à la maturité sexuelle (18 mois). Elles ont été traitées journellement par voie orale avec des doses de 100, 500, ou 2 500 mg/kg. Les analyses morphologiques du tractus génital femelle révèlent une augmentation du poids des ovaires et de l'utérus aux doses de 500 et 2 500 mg/kg. De plus, les niveaux d'œstradiol circulant sont élevés chez les femelles de ces deux groupes. En revanche, aucun changement significatif n'est observé en histologie dans les utérus et ovaires, si ce n'est un nombre un peu plus élevé de corps jaunes que dans les témoins (Tomonari et coll., 2006).

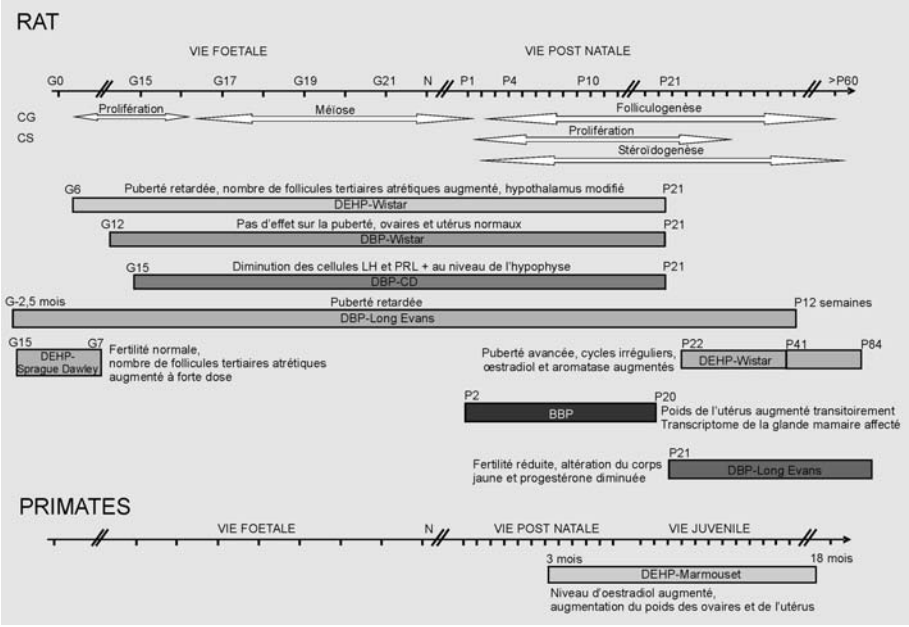


Figure 36.1 : Résumé des effets du DEHP, du BBP et du DBP chez les animaux femelles

CS : Cellule germinale ; CS : Cellule somatique

En conclusion, l'analyse de la littérature indique qu'il existe des effets délétères des phtalates sur la fonction de reproduction femelle (figure 36.1, tableaux 36.I et 36.II). Ces effets concernent principalement la puberté dont l'apparition peut être avancée ou retardée selon le composé et le moment d'administration de celui-ci. Rappelons que la gestation est la période où les niveaux de phtalates sont les plus élevés au cours de la vie, comme le montre une étude chez le mouton (Herreros et coll., 2010). La production d'œstradiol est affectée par le DEHP et son principal métabolite le MEHP. Les deux études menées avec le DEHP chez le rat et le marmouset, l'une par inhalation chez le rat, l'autre par voie orale, indiquent dans les deux cas, une augmentation des niveaux d'œstradiol. Cette augmentation pourrait être à l'origine de l'atrésie folliculaire observée dans l'ovaire. Il est à noter que les différents phtalates ne produisent pas les mêmes effets et que ceux-ci peuvent différer d'une espèce à l'autre. Il est également intéressant de noter que les quelques études qui ont effectué des analyses à différents temps après l'exposition ont mis en évidence une certaine réversibilité des effets sur le long terme et il est important à l'avenir de procéder à des études longitudinales, voire multi- et transgénérationnelles.

Bibliographie

ANDRADE AJ, GRANDE SW, TALSNESS CE, GROTE K, CHAHOUD I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 2006, **227** : 185-192

FABER WD, DEYO JA, STUMP DG, NAVARRO L, RUBLE K, KNAPP J. Developmental toxicity and uterotrophic studies with di-2-ethylhexyl terephthalate. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007, **80** : 396-405

GRANDE SW, ANDRADE AJ, TALSNESS CE, GROTE K, CHAHOUD I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development. *Toxicol Sci* 2006, **91** : 247-254

GRANDE SW, ANDRADE AJ, TALSNESS CE, GROTE K, GOLOMBIEWSKI A, et coll. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology* 2007, **229** : 14-22

GRAY LE JR, LASKEY J, OSTBY J. Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 2006, **93** : 189-95

GUERRAMT, SCARANO WR, DE TOLEDO FC, FRANCI JA, KEMPINAS WDE G. Reproductive development and function of female rats exposed to di-eta-butyl-phthalate (DBP) in utero and during lactation. *Reprod Toxicol* 2010, **29** : 99-105

HERREROS MA, GONZALEZ-BULNES A, INIGO-NUNEZ S, LETELIER C, CONTRERAS-SOLIS I, et coll. Pregnancy-associated changes in plasma concentration of the endocrine disruptor di(2-ethylhexyl) phthalate in a sheep model. *Theriogenology* 2010, **73** : 141-146

LEE KY, SHIBUTANI M, TAKAGI H, KATO N, TAKIGAMI S, et coll. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 2004, **203** : 221-238

MA M, KONDO T, BAN S, UMEMURA T, KURAHASHI N, et coll. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci* 2006, **93** : 164-171

MORAL R, WANG R, RUSSO IH, MAILO DA, LAMARTINIERE CA, RUSSO J. The plasticizer butyl benzyl phthalate induces genomic changes in rat mammary gland after neonatal/prepubertal exposure. *BMC Genomics* 2007, **8** : 453

SAILLENFAIT AM, GALLISSOT F, SABATÉ JP. Evaluation of the developmental toxicity of diallyl phthalate administered orally to rats. *Food Chem Toxicol* 2008, **46** : 2150-2156

SAILLENFAIT AM, GALLISSOT F, SABATE JP. Differential developmental toxicities of di-n-hexyl phthalate and dicyclohexyl phthalate administered orally to rats. *J Appl Toxicol* 2009, **29** : 510-521

SALAZAR V, CASTILLO C, ARIZNAVARRETA C, CAMPÓN R, TRESGUERRES JA. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology* 2004, **205** : 131-137

TAKAI R, HAYASHI S, KIYOKAWA J, IWATA Y, MATSUO S, et coll. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 10) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci* 2009, **34** (suppl 1) : SP111-119

TOMONARI Y, KURATA Y, DAVID RM, GANS G, KAWASUSO T, KATOH M. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets: I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study. *J Toxicol Environ Health A* 2006, **69** : 1651-1672

37
Études sur cultures d'organes et cellulaires

Pour appréhender les mécanimes d'action des phtalates sur le développement testiculaire chez le mâle, des travaux ont été menés sur des cultures d'organes. Le modèle de culture organotypique est fréquemment utilisé pour analyser l'impact à court terme d'une substance chimique sur le développement testiculaire. Ce modèle a l'avantage de conserver les interactions entre cellules somatiques et cellules germinales qui sont cruciales pour le bon développement des gonades. C'est par ailleurs le seul modèle qui permet d'adresser expérimentalement l'effet d'un perturbateur sur le développement de la gonade fœtale humaine. Différents travaux ont rapporté des effets des phtalates en culture organotypique de testicules fœtaux ou néonatals. Dans ce modèle, il est possible d'appréhender l'effet direct des phtalates sur le testicule fœtal et de contrôler précisément la dose d'exposition mais la prise en compte des différents métabolites produits *in vivo* est plus difficile à intégrer.

Les données obtenues suite aux expositions *in vivo* chez l'animal indiquent que l'ovaire est un organe cible de l'action des phtalates chez la femelle. Différents modèles cellulaires ont été développés pour étudier les effets des phtalates sur l'ovaire.

Les études toxicologiques *in vivo* ont essentiellement utilisé le DEHP ou le DBP alors que la plupart des études *in vitro* ont mesuré l'effet du MEHP (métabolite du DEHP) ou du MBP (métabolite du DBP).

Modèle d'étude sur cultures d'organes du développement testiculaire

Le groupe de R. Habert a étudié l'effet du MEHP (10 et 100 µM) sur des testicules fœtaux, issus de produits d'interruption volontaire de grossesse, âgés de 7 à 12 semaines de gestation (Lambrot et coll., 2009). Pour cela, un testicule a été traité au MEHP durant 72 h et ses paramètres ont été comparés à ceux du testicule contra-latéral qui sert de témoin ce qui permet de s'affranchir de la variabilité inter-individus. Dans ce modèle, le MEHP ne modifie ni

la sécrétion de testostérone ni l'expression des enzymes de biosynthèse des stéroïdes. Une absence d'effet du DBP ou de son métabolite, le MBP (1 mM), avait également été rapportée sur les cellules de Leydig dans des testicules fœtaux humains plus âgés, de 15 à 20 semaines (Hallmark et coll., 2007).

Deux études du groupe de R. Sharpe rapportent qu'une exposition *in utero* n'altère pas durablement la production de testostérone chez le marmouset (Hallmark et coll., 2007 ; McKinnell et coll., 2009). Ces données sont surprenantes au regard des nombreux travaux qui démontrent une baisse de la production de testostérone en réponse à une exposition *in utero* au DBP ou au DEHP chez le rat (Mylchreest et coll., 2002 ; Fisher et coll., 2003 ; Thompson et coll., 2004 ; Wilson et coll., 2004 ; Mahood et coll., 2005 ; Borch et coll., 2006 ; Mahood et coll., 2006 ; Hallmark et coll., 2007 ; Culty et coll., 2008 ; Lin et coll., 2008a ; Howdeshell et coll., 2008).

Par ailleurs, des données sur culture d'organe chez le rat indiquent soit une baisse de la production de testostérone en réponse au MEHP, métabolite du DEHP (Chauvigné et coll., 2009), soit une absence d'effet du MBP, métabolite du DBP (Hallmark et coll., 2007). Ces observations sur cultures d'organes divergentes peuvent être attribuées à l'utilisation de différents types de phtalates ou à des expositions à des âges variables. L'absence d'effet du MBP sur culture d'organe a été décrite en fin de gestation, lorsque la production de testostérone atteint un plateau chez le rat, alors que l'effet du MEHP (baisse de la production de testostérone) a été rapporté au début de l'organogenèse testiculaire, lorsque la production de testostérone augmente fortement. L'intervention d'effets extra-testiculaires ne peut cependant être exclue et des travaux additionnels seront nécessaires pour comprendre ces différences.

Chez la souris, aucun effet n'a été observé *in utero* (Gaido et coll., 2007). Sur culture d'organes, des effets positifs et négatifs sur la stéroïdogenèse testiculaire fœtale ont été rapportés selon l'âge ou la présence de LH (Lehraiki et coll., 2009). Les effets sur la production de testostérone apparaissent donc variables selon l'espèce et le mode d'administration des phtalates, *in vivo* ou *in vitro*.

Une autre altération induite par le MEHP dans le testicule fœtal humain est la diminution des fonctions sertoliennes et notamment la diminution de l'expression de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) (Lambrot et coll., 2009). Cet effet a également été retrouvé dans les testicules fœtaux de rat et de souris en culture organotypique (Li et Kim, 2003 ; Chauvigné et coll., 2009 ; Lehraiki et coll., 2009). Cette observation n'a pas encore été décrite *in vivo* probablement du fait de la nature transitoire de cette sécrétion mais la persistance des canaux de Müller, futur tractus femelle, n'a pas non plus été rapportée. En revanche, plusieurs études montrent qu'un traitement *in utero* chez le rat induit une désorganisation des cordons testiculaires (formés par les cellules de Sertoli) sans pour autant que celle-ci soit systématiquement décrite.

Enfin, l'effet le plus marquant des travaux sur le testicule fœtal humain est l'observation d'un effet pro-apoptotique du MEHP sur les cellules germinales (Rouiller-Fabre et coll., 2008 ; Lambrot et coll., 2009). L'exposition au MEHP pendant 72 h sur culture d'organe augmente significativement l'apoptose des gonocytes humains, les cellules germinales précurseurs de spermatogonies, et ce dès 10 µM. Dans cette étude, l'apoptose a été détectée par immunohistochimie de la caspase-3 clivée. Cet effet est corrélé à une diminution du nombre de gonocytes de 40 % à 100 µM. Cet effet a également été retrouvé dans les testicules fœtaux en culture de rats (Chauvigné et coll., 2009) et de souris (Lehraiki et coll., 2009). Sur ce point, les travaux effectués chez la souris apportent un éclairage particulier grâce à l'utilisation de souris mutantes pour le récepteur aux œstrogènes et pour le récepteur aux androgènes qui a permis de démontrer que l'effet apoptotique germinal du MEHP était indépendant des récepteurs nucléaires canoniques aux œstrogènes et androgènes (Lehraiki et coll., 2009). Deux études décrivent un effet semblable lors d'une exposition *in utero* chez le rat (Fisher et coll., 2003 ; Ferrara et coll., 2006). Cette atteinte des cellules germinales pendant la vie fœtale pourrait expliquer les altérations de la fertilité mâle décrite chez le rat adulte après une exposition *in utero* (Mahood et coll., 2006 ; Ferrara et coll., 2006).

Il semble qu'il existe une fenêtre critique d'exposition au cours du développement testiculaire puisque chez les rongeurs les effets sur la fertilité semblent moins prononcés après une exposition postnatale *in vivo* mais il existe des données contradictoires sur ce point. Sur culture d'organe, les cellules germinales du testicule fœtal de souris présentent une plus forte sensibilité au stade jeune (Lehraiki et coll., 2009). Ces stades correspondent aux stades auxquels un effet a été rapporté sur les cellules germinales humaines. Cependant, une étude sur culture d'organe de rat ne montre pas d'effet sur la lignée germinale durant la vie fœtale mais exclusivement en période postnatale (Li et Kim, 2003). Il est à noter que dans ce travail seule la densité et non le nombre total de gonocyte a été mesuré.

La figure 37.1 résume les principaux effets des phtalates sur le testicule fœtal chez le rat, la souris et l'homme. L'effet des phtalates en culture organotypique est extrêmement variable sur la production de testostérone et ne permet pas encore de conclure à une atteinte testiculaire directe dans le testicule fœtal humain en dépit des nombreuses altérations leydigiennes rapportées chez les rongeurs.

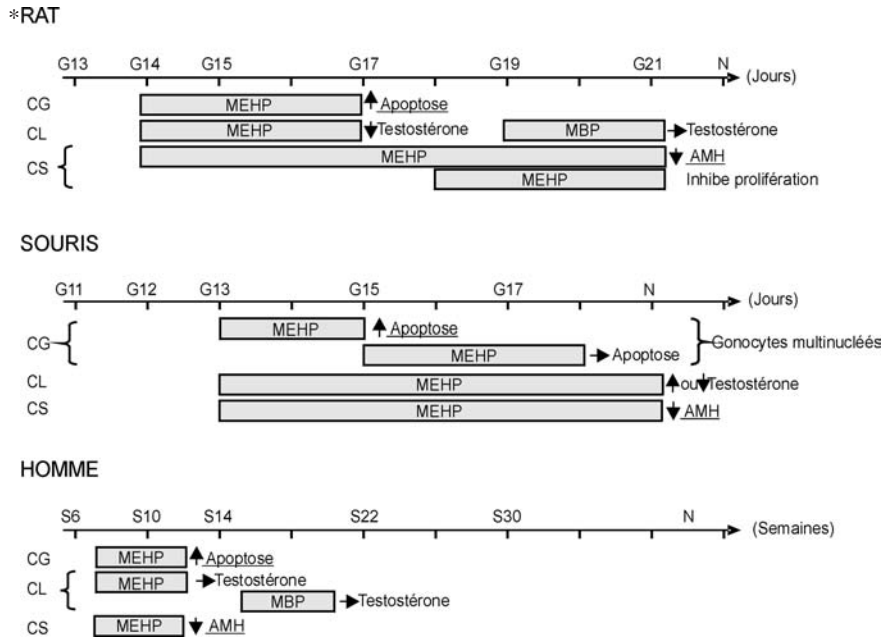


Figure 37.1 : Schéma récapitulatif des principaux effets des phtalates sur culture de testicule fœtal d'après les études analysées

Les périodes d'exposition et les phtalates impliqués sont indiqués dans les rectangles gris. Le début de la flèche correspond à la première étape de la différenciation testiculaire. Les effets retrouvés chez différentes espèces sont soulignés. Les effets sont décomposés selon les types cellulaires affectés. CG : cellules germinales ; CS : cellules de Sertoli ; CL : cellules de Leydig ; Testo : testostérone ; AMH : Hormone anti-Müllérienne

Modèles cellulaires en relation avec les fonctions reproductrices mâles

Après exposition à de faibles doses de MBzP (100 et 1 000 nM/l), des cellules de Leydig tumorales murines (MCTL-1) ont une activité stéroïdogénique accrue. Ceci est corrélé avec une augmentation du niveau d'expression transcriptionnelle et protéique du gène *StAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*) (Wang et coll., 2006). Cette observation va à l'encontre du rôle anti-stéroïdogénique des phtalates à forte dose reporté par ce même groupe et d'autres, et supporte l'existence d'une réponse dose-dépendante en U inversé.

Modèles cellulaires d'études des effets sur l'ovaire, ovocytes et glande mammaire

Chez la femelle, les données obtenues suite aux expositions *in vivo* indiquent que l'ovaire est un organe cible de l'action des phtalates. Le DEHP et son métabolite, le MEHP, ont principalement été testés. Leur principal effet est une altération de la production et du métabolisme de l'œstradiol par les cellules de granulosa.

Cellules dérivées de l'ovaire

Différents modèles cellulaires ont été développés pour étudier les effets des phtalates sur l'ovaire :

- des cultures de follicules entiers, certainement plus proches de la physiologie d'un ovaire sain car le follicule est un système complexe contenant différents types cellulaires, tous en interaction les uns avec les autres (ovocytes, cellules de granulosa, et cellules de la thèque) ;
- des cultures primaires de cellules de granulosa fraîchement isolées de follicules mais qui ont le désavantage d'être coupées des interactions cellulaires et hormonales qui existent dans le follicule natif ;
- des lignées issues de cellules tumorales souvent bien éloignées des cellules natives dont elles sont issues et qui ont des caractéristiques parfois différentes de celles-ci.

Follicules entiers

Chez la souris (CD-1), des follicules à antrum ont été isolés à partir d'ovaires de femelles âgées de 32-35 jours puis mis en culture en présence de DEHP (1, 10 et 100 µg/ml) et MEHP (0,1, 1 et 10 µg/ml). La croissance des follicules a été mesurée toutes les 24 h et l'œstradiol dosé dans les milieux de culture. Le DEHP et le MEHP inhibent la croissance des follicules et diminuent la production d'œstradiol aux deux doses les plus fortes. Ces deux molécules diminuent également le niveau d'ARNm du gène de l'aromatase et de deux facteurs contrôlant le cycle cellulaire (Ccnd2 et Cdk4) (Gupta et coll., 2010). L'addition d'œstradiol dans le milieu de culture prévient l'inhibition de croissance induite par le DEHP et le MEHP ainsi que la réduction des niveaux d'œstradiol et la diminution de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire. Ainsi, le DEHP et le MEHP peuvent directement inhiber la croissance des follicules préovulatoires (à antrum). Cependant, il a été montré une différence de sensibilité des follicules au DEHP par rapport au MEHP, et proposé que l'aromatase (enzyme qui convertit la testostérone en œstradiol) soit une cible directe du DEHP. Les deux molécules pourraient agir à travers des voies différentes (Gupta et coll., 2010).

Chez la souris (C57BL/6jxCBA/Ca), un modèle de culture *in vitro* de follicules préantraux a été développé pour tester les effets du MEHP (10 ; 20 ;

50 ; 100 ; 200 µM) (Lenie et Smitz, 2009). Il est à noter que les follicules sont prélevés à des stades plus jeunes et maintenus en culture plus longtemps que dans l'expérience précédente. Il est rapporté une légère augmentation des niveaux de testostérone produits par les follicules traités au MEHP consistant avec une accumulation du substrat (testostérone) due à une diminution de l'aromatisation en œstrogènes ; cela est confirmé par une diminution du ratio E2/T dès la dose de 50 µM de MEHP. Il est également montré une production prématurée de progestérone et une capacité réduite à produire des œstrogènes ainsi qu'une augmentation du métabolisme de l'œstradiol (Lenie et Smitz, 2009). Ces observations conduisent à l'hypothèse selon laquelle le MEHP pourrait perturber le déroulement de la différenciation du follicule préantral causant ainsi une lutéinisation prématurée de celui-ci.

Cellules de granulosa

En 2001 puis 2003, une équipe américaine a développé un modèle de culture primaire de cellules de granulosa de rat (Fisher 344) afin d'étudier les effets du MEHP (50 µM) (Lovekamp-Swan et coll., 2003). Les auteurs ont montré que le MEHP diminuait la production d'œstradiol et l'activité de l'enzyme aromatase, et que ces effets sont similaires à ceux obtenus en traitant les cellules avec un activateur de *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) alpha. Ils ont également montré que le MEHP pouvait agir via les deux récepteurs PPAR (α et γ) présents dans ces cellules pour réguler des gènes clefs de la différenciation des cellules de la granulosa (aromatase notamment) (Lovekamp-Swan et coll., 2003).

Dans les cellules de granulosa isolées de rat, le traitement par le MEHP conduit à l'activation des voies de signalisation contrôlées par des récepteurs PPAR α et γ. Les isoformes du récepteur entraînent la suppression de l'aromatase et l'induction de *fatty acid binding protein* (FABP). L'activation de PPARα et PPARγ altère la production et le métabolisme des stéroïdes entraînant une différenciation anormale des cellules de granulosa *in vitro*.

Afin d'élucider les mécanismes par lesquels le MEHP régule négativement la transcription de l'aromatase (CYP19), des cellules KGN dérivées d'une lignée humaine tumorale de cellules de granulosa ont été utilisées. À toutes les doses de MEHP testées en culture (1, 10, 100 et 300 µM), l'activité enzymatique et la transcription du gène codant l'aromatase sont diminuées. Il a été également montré dans cette étude que le MEHP induit l'expression de GIOT-1 (*Gonadotrophin-inducible ovarian transcription factor-1*), un répresseur transcriptionnel présent à la fois dans les cellules de la thèque interne et de la granulosa de l'ovaire. Le modèle proposé est le suivant : le MEHP inhibe l'expression du gène de l'aromatase dans les cellules KGN en induisant l'expression du répresseur GIOT-1 lui-même induit par NR4As (Ohno et coll., 2009). Cette réduction significative de l'expression du récepteur aux œstrogènes, observée avec le MEHP, n'est pas retrouvée avec le DEHP, DBP ou MBP (Ohno et coll., 2009).

Des cellules KK-1 dérivées d'une lignée humaine tumorale de granulosa ont également été utilisées pour tester l'effet du MEHP (25-100 µM) sur la stéroïdogenèse basale et induite par hCG (*human chorionic gonadotrophin*) (Gunnarsson et coll., 2008). Le MEHP à 100 µM induit une augmentation de la synthèse basale des stéroïdes en augmentant le taux de cholestérol disponible pour la stéroïdogenèse. Les auteurs formulent l'hypothèse que le MEHP stimulerait la stéroïdogenèse basale en activant des facteurs de transcription induits par la famille des récepteurs PPAR. L'activation de PPAR induirait alors l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, augmentant ainsi le substrat pour la synthèse des stéroïdes. Cet effet stimulateur aurait lieu avant la formation de la prégnènolone (Gunnarsson et coll., 2008).

Une autre étude faisant appel à des cellules de granulosa humaines saines récupérées à partir de follicules lors de procédure de fécondation *in vitro*, a montré l'effet inhibiteur du MEHP (0-500 µM) sur l'activité et le niveau d'ARNm de l'aromatase. Aucun effet n'est observé sur la production de progestérone (Reinsberg et coll., 2009).

Chez le rat, sur des cultures primaires de cellules de granulosa, le MEHP (100 µM) réduit l'accumulation d'AMPc de 40 % lors de stimulation par la FSH de ces cellules. De plus, la production de progestérone est inhibée de manière dose-dépendante par le MEHP (Treinen et coll., 1990).

Plus récemment, un système de cultures de cellules de granulosa *ex vivo* a été développé pour étudier les effets du DEHP sur la stéroïdogenèse de ces cellules (Svechnikova et coll., 2007). Des rates femelles sont exposées par gavage oral à 500 mg/kg/j de DEHP pendant 10 jours. Les dosages sériques réalisés sur ces animaux révèlent une diminution de deux à cinq fois des niveaux de progestérone et de d'œstradiol, respectivement. Puis des cultures primaires de cellules de granulosa issues des ovaires de ces animaux sont analysées : elles produisent moins (-30 %) de progestérone en réponse à une stimulation par la LH et la FSH. Ainsi, ces cellules de granulosa traitées *in vivo* ont une capacité moindre de réponse aux hormones gonadotropes. De plus, il a été montré que le transport du cholestérol dans la mitochondrie est altéré dans les cellules traitées en comparaison avec les témoins.

Chez les ruminants, une étude a été menée chez la vache faisant appel à des cultures primaires de cellules de granulosa récupérées sur des ovaires d'abattoir. Les cultures ont été traitées soit avec du DEHP soit du MEHP (0,1, 1 et 10 ng/ml). Les deux molécules stimulent la sécrétion d'ocytocine par les cellules de granulosa, avec un effet plus important du MEHP que du DEHP. De plus, la sécrétion d'ocytocine est stimulée plus efficacement par les faibles doses de MEHP. La perturbation de la sécrétion d'ocytocine peut avoir un effet négatif sur le déroulement du cycle œstrien (Wang et coll., 2010).

Ovocytes

Une seule étude a testé l'effet direct du MEHP sur la maturation *in vitro* de l'ovocyte et le début du développement embryonnaire chez la souris. Des ovocytes dénudés de leurs cellules de granulosa ont été cultivés en présence de 50, 100, 200, et 400 µM de MEHP pendant 24 h, puis les ovocytes ont été fécondés et les embryons cultivés pendant 4 jours. La proportion d'ovocytes qui progressent jusqu'au stade métaphase II est significativement diminuée, de manière dose dépendante. Le nombre d'embryons ayant atteint le stade 2 cellules, 24 h après fécondation, est de 28 % à 400 µM de MEHP contre 49 % pour les témoins cultivés sans MEHP. Aucun des embryons traités avec du MEHP quelle que soit la dose n'atteint le stade 8 cellules (Dalman et coll., 2008).

Utérus

Au vu des effets observés *in vitro* sur la production d'œstradiol, on pouvait s'attendre à des effets sur l'utérus, un organe sensible aux œstrogènes. Cependant, peu d'études ont recherché des effets sur l'utérus *in vitro*.

Chez les bovins, il a été développé des cultures primaires de cellules endométriales. Celles-ci ont été traitées avec différentes doses de DEHP et MEHP (0,1, 1 et 10 ng/ml). Il en ressort que les deux molécules stimulent la sécrétion de la prostaglandine PGF2 alpha et inhibent la sécrétion de la prostaglandine PGE2 dans ces cellules. Le ratio PGF2/PGE2 est altéré, il passe de 1/1 chez les témoins, à 1/4-1/10 chez les traités. Ce ratio est très important dans l'établissement de la gestation, son altération pouvant entraîner une augmentation des contractions et une accélération de la régression du corps jaune (Wang et coll., 2010).

Chez l'Homme, des cultures primaires de cellules endométriales récupérées lors d'hystérectomie ont été cultivées avec du DBP aux doses de 0, 1, 50 et 100 µM. À toutes les doses, le traitement avec le DBP entraîne une diminution de la prolifération des cellules endométriales endothéliales (Bredhult et coll., 2007).

Glande mammaire

Plusieurs phtalates (DEHP, BBP, MBP, DINP et DIDP) ont été testés sur des lignées cellulaires dérivées de tumeurs de glandes mammaires, dont les cellules MELN et MCF-7 exprimant le récepteur alpha aux œstrogènes. L'objet de l'étude était d'évaluer la capacité de ces phtalates à induire l'expression de VEGF, un facteur de croissance impliqué dans la néo-vascularisation et la progression des tumeurs mammaires, qui est régulé par les œstrogènes. Il a été montré que le BBP et le DEHP (10^{-5}-10^{-7}M) régulent positivement l'expression de VEGF dans les cellules MELN via un mécanisme dépendant du

récepteur alpha des œstrogènes. Le BBP se révèle le composé le plus actif (Buteau-Lozano et coll., 2008).

Une étude menée également sur des cellules tumorales mammaires humaines (MCF-7) rapporte une augmentation de l'expression du récepteur aux œstrogènes ERα après culture en présence de 10 µM de BBP et du récepteur ERβ en présence de la même dose de BBP ou de DEHP (Kang et coll., 2005). Le DBP ne semble pas avoir d'effet sur le niveau d'expression des ER. Cependant, une baisse de méthylation est retrouvée au niveau du promoteur du gène ERα après culture avec n'importe quelle famille de phtalates. Il est à souligner que les résultats présentés dans cet article sont de faible qualité et qu'il n'existe pas de méthodes de quantification précise.

Une étude a été réalisée comparant l'activité œstrogénique de plusieurs phtalates (BBP, DCHP, DEHP, DBP) dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (rat Sprague-Dawley, 600 mg/kg/j du jour 14 à 16 postnatal, observation au jour 17) en mesurant l'expression d'un gène cible des œstrogènes, la *Calbindine-D9k*. Les cellules utilisées sont des cellules MCF-7 issues d'une lignée cellulaire humaine de cancer du sein. Il apparaît qu'aucun des phtalates utilisés n'induit l'expression de l'ARN ou de la protéine Calbindine-D9k dans l'utérus des animaux traités. En revanche, ces phtalates sont capables d'induire la prolifération des cellules MCF-7 en culture (effet œstrogénique). Il est intéressant de noter que selon le test utilisé pour mettre en évidence un effet œstrogénique d'une molécule, on peut obtenir des résultats contradictoires (Hong et coll., 2005).

Enfin, une autre étude menée sur des cellules MCF-7 montre que la culture en présence de 1, 10 et 100 µM de DEHP perturbe l'expression d'un large spectre de gènes impliqués dans le développement du système nerveux central (Hokanson et coll., 2006). La signification biologique de ce résultat reste incertaine.

En conclusion, l'effet des phtalates en culture organotypique est extrêmement variable sur la production de testostérone et ne permet pas encore de conclure à une atteinte testiculaire directe dans le testicule fœtal humain. Des effets néfastes des phtalates sur les cellules germinales et les cellules de Sertoli apparaissent en revanche clairement et de manière cohérente mais le mécanisme d'action des phtalates sur ces types cellulaires est encore à identifier et nécessitera des études complémentaires. Il semble donc qu'il n'existe pas de lien causal entre une éventuelle baisse de la production de testostérone induite par les phtalates et la chute du nombre de cellules germinales.

Les études *in vitro* montrent clairement une diminution de la production d'œstradiol par les cellules folliculaires ovariennes suite à l'exposition au DEHP et son principal métabolite le MEHP. Cependant, il a été montré une différence de sensibilité des follicules au DEHP *versus* au MEHP, et proposé que l'aromatase (enzyme qui convertit la testostérone en œstradiol) soit une

cible directe du DEHP. Les deux molécules pourraient agir à travers des voies différentes. D'après ces études, l'action du DEHP et du MEHP s'effectuerait via les récepteurs PPAR. Des mécanismes d'action ont été proposés pour le MEHP mais doivent être vérifiés *in vivo* et dans d'autres espèces que chez les rongeurs afin d'être validés.

D'autres organes que l'ovaire apparaissent également des cibles potentielles des phtalates, comme l'hypophyse ou l'hypothalamus au niveau cérébral ou encore l'utérus et la glande mammaire comme en témoignent quelques études *in vitro*. Il semblerait que l'action sur ces organes se fasse via les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, l'action via PPAR n'a pas été étudiée sur d'autres organes que l'ovaire.

Bibliographie

BORCH J, METZDORFF SB, VINGGAARD AM, BROKKEN L, DALGAARD M. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 2006, **223** : 144-155

BREDHULT C, BACKLIN BM, OLOVSSON M. Effects of some endocrine disruptors on the proliferation and viability of human endometrial endothelial cells in vitro. *Reprod Toxicol* 2007, **23** : 550-559

BUTEAU-LOZANO H, VELASCO G, CRISTOFARI M, BALAGUER P, PERROT-APPLANAT M. Xenœogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *J Endocrinol* 2008, **196** : 399-412

CHAUVIGNE F, MENUET A, LESNE L, CHAGNON MC, CHEVRIER C, et coll. Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 515-521

CULTY M, THUILLIER R, LI W, WANG Y, MARTINEZ-ARGUELLES DB, et coll. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod* 2008, **78** : 1018-1028

DALMAN A, EIMANI H, SEPEHRI H, ASHTIANI SK, VALOJERDI MR, et coll. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on resumption of meiosis, in vitro maturation and embryo development of immature mouse oocytes. *Biofactors* 2008, **33** : 149-155

FERRARA D, HALLMARK N, SCOTT H, BROWN R, MCKINNELL C, et coll. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006, **147** : 5352-5362

FISHER JS, MACPHERSON S, MARCHETTI N, SHARPE RM. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003, **18** : 1383-1394

GAIDO KW, HENSLEY JB, LIU D, WALLACE DG, BORGHOFF S, et coll. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007, **97** : 491-503

GUNNARSSON D, LEFFLER P, EKWURTZEL E, MARTINSSON G, LIU K, SELSTAM G. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate stimulates basal steroidogenesis by a cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes. *Reproduction* 2008, **135** : 693-703

GUPTA RK, SINGH JM, LESLIE TC, MEACHUM S, FLAWS JA, YAOHH. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, **242** : 224-230

HALLMARK N, WALKER M, MCKINNELL C, MAHOOD IK, SCOTT H, et coll. Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat: comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 390-396

HOKANSON R, HANNEMAN W, HENNESSEY M, DONNELLY KC, MCDONALD T, et coll. DEHP, bis(2)-ethylhexyl phthalate, alters gene expression in human cells: possible correlation with initiation of fetal developmental abnormalities. *Hum Exp Toxicol* 2006, **25** : 687-695

HONG EJ, JI YK, CHOI KC, MANABE N, JEUNG EB. Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D9k. *J Reprod Dev* 2005, **51** : 253-263

HOWDESHELL KL, WILSONVS, FURR J, LAMBRIGHT CR, RIDER CV, et coll. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci* 2008, **105** : 153-165

KANGSC, LEE BM. DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2005, **68** : 1995-2003

LAMBROT R, MUCZYNSKI V, LECUREUIL C, ANGENARD G, COFFIGNY H, et coll. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 32-37

LEHRAIKI A, RACINE C, KRUST A, HABERT R, LEVACHER C. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 372-382

LENIE S, SMITZ J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol Reprod* 2009, **80** : 685-95

LI H, KIM KH. Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod* 2003, **69** : 1964-1972

LIN H, GE RS, CHEN GR, HU GX, DONG L, et coll. Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci* U S A 2008a, **105** : 7218-7222

LOVEKAMP-SWAN T, JETTEN AM, DAVISBJ. Dual activation of PPARalpha and PPAR-gamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003, **201** : 133-141

MAHOOD IK, HALLMARK N, MCKINNELL C, WALKER M, FISHER JS, et coll. Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 2005, **146** : 613-623

MAHOOD IK, MCKINNELL C, WALKER M, HALLMARK N, SCOTT H, et coll. Cellular origins of testicular dysgenesis in rats exposed in utero to di(n-butyl) phthalate. *Int J Androl* 2006, **29** : 148-154

MCKINNELL C, MITCHELL RT, WALKER M, MORRIS K, KELNAR CJ, et coll. Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod* 2009, **24** : 2244-2254

MYLCHREEST E, SAR M, WALLACE DG, FOSTER PM. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002, **16** : 19-28

OHNO S, YUKINAWA F, NODA M, NAKAJIN S. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces NR4A subfamily and GIOT-1 gene expression, and suppresses CYP19 expression in human granulosa-like tumor cell line KGN. *Toxicol Lett* 2009, **191** : 353-359

REINSBERG J, WEGENER-TOPER P, VAN DER VEN K, VAN DER VEN H, KLINGMUELLER D. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, **239** : 116-123

ROUILLER-FABRE V, LAMBROT R, MUCZYNSKI V, COFFIGNY H, LECUREUIL C, et coll. Development and regulations of testicular functions in the human foetus. *Gynecol Obstet Fertil* 2008, **36** : 898-907

SVECHNIKOVA I, SVECHNIKOV K, SÖDER O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol* 2007, **194** : 603-609

THOMPSON CJ, ROSS SM, GAIDO KW. Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinology* 2004, **145** : 1227-1237

TREINEN KA, DODSON WC, HEINDEL JJ. Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990, **106** : 334-340

WANG Y, SONG L, HONG X, CUI L, ZHANG Z, et coll. Low concentrations mono-butyl phthalate stimulates steroidogenesis by facilitating steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse Leydig tumor cells (MLTC-1). *Chem Biol Interact* 2006, **164** : 15-24

WILSON VS, LAMBRIGHT C, FURR J, OSTBY J, WOOD C, et coll. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett* 2004, **146** : 207-215

38
Études chez les poissons et autres espèces de vertébrés

Outre les mammifères, les effets des phtalates ont été étudiés chez de nombreuses espèces de vertébrés comme par exemple plusieurs espèces de poissons téléostéens (le zebrafish et le medaka, mais aussi : la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* ; le saumon, *Salmo salar* ; le loup de mer, *Dicentrarchus labrax* ; l'épinoche, *Gasterosteus aculeatus* ; la carpe, *Cyprinus carpio* ; le vairon, *Pimephales promelas* ; le guppy, *Poecilia reticulata*), des amphibiens (le xénope et la grenouille *Rana rugosa*) ou des oiseaux comme la caille ou le poulet. Beaucoup de ces études décrivent simplement les effets de telle ou telle molécule sur des critères assez disparates, ce qui rend une description globale des effets quelque peu difficile vu la diversité des molécules testées. En outre, de nombreuses études de toxicité aiguë ont été menées et ces travaux indiquent des effets toxiques variables en fonction du poids moléculaire des différentes molécules, les phtalates de bas poids moléculaire ayant des effets toxiques plus prononcés que les molécules de haut poids moléculaire. Un petit nombre d'études ont des implications en ce qui concerne les mécanismes d'action, qu'il est intéressant de comparer avec ce qui est connu chez les mammifères. Des recherches ont également été menées sur certains invertébrés (moule, copépodes...) mais ne seront pas décrites ici même s'il apparaît que certains invertébrés comme les mollusques et les crustacés sont sensibles à des doses significativement plus faibles que les poissons téléostéens. Ces différences d'effets semblent être reliées à des variations importantes de bioconcentration de ces molécules au sein des organismes. Une revue générale de l'impact des phtalates sur la vie sauvage a été publiée récemment (Oehlmann et coll., 2009).

Effets sur des paramètres liés à la reproduction

Chez le mâle

Les effets des phtalates ont été surtout étudiés chez le medaka, un poisson téléostéen pour lequel le mécanisme de détermination du sexe mâle est connu et qui constitue donc un excellent modèle. Ces études menées sur les medaka n'ont pas observé d'effets majeurs sur des paramètres globaux en traitant à des

doses faibles. Ainsi, Shioda et Wakabayashi (2000) en traitant pendant deux semaines des médaka mâles adultes à des doses de DEHP de 0,1, 0,3 ou 1 µM n'ont pas observé d'effet sur le nombre d'œufs fécondés par ces mâles. Des résultats similaires ont été obtenus par Kim et coll. (2002) qui ont traité des animaux au DEHP de la naissance à l'âge de 3 mois à des doses allant jusqu'à 50 µM/l et n'ont observé aucune anomalie histologique de la gonade. Ce dispositif expérimental produit un effet chez les femelles (voir ci-dessous) mais pas chez les mâles, ce qui pourrait suggérer une différence de sensibilité entre les sexes. Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans une étude multigénérationelle menée chez le medaka, Patyna et coll. (2006) observent une induction de plusieurs métabolites de la testostérone après un traitement avec du DINP à 1 µg/g/j même si cette étude est très difficilement comparable aux précédentes puisque la molécule testée, le mode d'exposition et le dispositif expérimental sont très différents.

Le même type de résultat a été observé chez le zebrafish après des traitements au DBP à 100 µg/l (Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2005). Cependant, récemment il a été montré par Uren-Webster et coll. (2010) que des traitements au DEHP à des doses plus élevées (0,5, 50 et 5 000 mg/kg) chez le zebrafish mâle induisent une réduction du succès de fécondation d'œufs pondus par des femelles non traitées, des anomalies de la spermatogenèse (suggérant que la progression de la méiose pourrait être perturbée) et une augmentation de l'expression de plusieurs gènes cibles connus des PPAR (*acox1*, *ehhadh*). De même, Oehlmann et coll. (2009) décrivent une altération de la qualité (motilité, forme) du sperme induite chez le zebrafish par un traitement au BBP à 15 µg/l. Chez le saumon, l'étude de Norman et coll. (2007) indique que des traitements chroniques au DEHP à de hautes doses (1 500 mg/kg pendant 4 semaines) produisent une faible quantité d'ovotestis chez 3 % des animaux traités. Cependant, cet effet n'est pas retrouvé dans une étude similaire (Metcalfe et coll., 2001). De tels effets ont également été observés par Lee et Veeramachaneni (2005) chez le xénope puisque des traitements tout au long de la spermatogenèse (stades 52 à 66) à des doses de 1 à 10 mg/l permettent d'observer des anomalies histologiques de la gonade mâle (vacuolisation des cellules de Sertoli, dénudation des cellules germinales, dysmorphologie des tubules séminifères...).

Chez la grenouille *Rana rugosa*, des traitements à 1 et 10 µM de DBP induisent des anomalies de la différenciation des testicules dans respectivement 7 et 17 % des animaux traités (Ohtani et coll., 2000). Ces données suggèrent que des effets à haute dose, sans doute médiés par les PPAR, pourraient affecter la gonade mâle. Les différences de sensibilité observées entre les modèles poissons et le xénope ne sont pas expliquées et peuvent sans doute être liées à un métabolisme différent des phtalates selon les organismes.

Il faut noter que des mesures de la capacité des phtalates (DBP) à induire dans le foie, chez le mâle traité, des protéines impliquées dans la vitellogenèse (vitellogénine, choriogénine) ont été également effectuées et se sont révélées

négatives chez le medaka (Nozaka et coll., 2004) comme chez le zebrafish (Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2005). Dans le cas des travaux de Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville (2005), un effet positif sur la prolifération des peroxysomes et l'induction hépatique de l'acyl CoA oxydase, une enzyme impliquée dans la b-oxydation peroxysomale, a été observé. Là encore, ces effets évoquent plutôt une action via les PPAR.

Chez la femelle

Les effets observés chez la femelle sont plus évidents que ceux décrits chez le mâle. Ainsi, dans la même série d'expériences (traitement au DEHP de la naissance à l'âge de 3 mois à des doses allant jusqu'à 50 µg/l) que celle décrite ci-dessus où aucun effet n'a été observé chez le mâle, Kim et coll. (2002) ont mis en évidence des effets clairs sur la gonade femelle. Le niveau de vitellogénine chez ces femelles traitées baisse à partir de 10 µg/l, le rapport gonadosomatique est diminué d'un tiers chez ces animaux et une diminution forte du nombre d'ovocytes matures est observée. Ces résultats ont été confirmés récemment chez le zebrafish par Carnevali et coll. (2010) qui ont traité des femelles à des doses faibles (de 0,02 à 40 µg/l) de DEHP. En étudiant les effets sur l'expression de différents marqueurs de la différenciation ovocytaire, ces auteurs démontrent qu'à des doses de 2 à 40 µg/l, le DEHP affecte la croissance des ovocytes, leur maturation, l'ovulation elle-même et plus généralement la capacité à produire des embryons. Un effet inducteur sur la vitellogénine plasmatique a également été observé dans cette étude, ce qui est en contradiction avec l'étude de Kim et coll. (2002). Ces différents travaux s'accordent toutefois sur un effet clair du DEHP sur la gonade femelle. Cependant, certaines études comme celle de Oehlmann et coll. (2009) montrent qu'un traitement au BBP à 15 µg/l n'induit pas d'effet sur le nombre d'œufs pondus ni sur la viabilité précoce (8 h post-fécondation) des embryons. Harries et coll. (2000) rapportent le même type de résultats négatifs avec le BBP chez le vairon.

Effets sur les embryons

Les effets des phtalates sur la reproduction ont été étudiés en ce qui concerne la production d'embryons et les anomalies éventuelles que ces molécules peuvent engendrer au cours du développement embryonnaire. Le zebrafish a été l'espèce la plus utilisée mais des études ont été menées chez le medaka, le saumon et le guppy ainsi que chez un amphibien, le xénope.

L'ensemble de ces études montre, lors de traitements embryonnaires ou larvaires, que les phtalates induisent une diminution de taille des animaux. Ainsi, chez le zebrafish, Lin et coll. (2008) observent après un traitement des parents au DBP à une dose de 625 µg/l une diminution de taille des embryons produits ainsi qu'une augmentation de la mortalité des embryons à 72 h de développement et logiquement, une diminution du pourcentage d'éclosion

des embryons. Les anomalies morphologiques éventuelles présentes chez ces embryons ne sont pas décrites. Une diminution de taille est également observée par Lee et coll. (2005) chez des embryons de xénopes traités au DBP à 0,1 mg/l. Une augmentation de la mortalité est décrite à des doses plus fortes (5 mg/l). Enfin chez le guppy, des traitements de larves au DEHP à 1 µg/l induisent une diminution de la taille et du poids des animaux ce qui indique que la croissance de ces animaux est fortement perturbée.

La gamme des effets morphologiques observée est vaste et aucune piste claire de mécanisme d'action ne peut en être dégagée. Chez le medaka, dans leur étude multigénérationelle, Patyna et coll. (2006) n'ont pas montré d'effet du DINP à 1 µg/g/j sur la production d'œufs mais ont noté un délai dans la mise en place de la pigmentation des hématies. Chez le zebrafish, Ortiz-Zarragoitia et coll. (2006) rapportent un effet embryonnaire du DBP à 100 µg/l en traitement continu après la fécondation. Les embryons montrent des malformations de la moelle épinière ainsi qu'une hypertrophie du sac vitellin. Cet effet sur le sac vitellin ou sur la morphogénèse n'est pas retrouvé par Raldua et coll. (2008) lorsque des embryons sont traités au DEHP à des doses allant jusqu'à 100 mg/l. La variété des effets morphologiques observés est sans doute à mettre en lien avec la variété des molécules testées et des espèces utilisées. Il manque clairement une étude plus complète sur ces effets embryonnaires.

Il faut noter que des effets sur le comportement des poissons traités (nage en banc, prise alimentaire) ont été décrits à de fortes concentrations (100 µg/l) chez l'épinoche (Wibe et coll., 2004) et chez la carpe (Barse et coll., 2007).

En conclusion, chez les poissons, les effets des phtalates sur les paramètres de la reproduction chez le mâle, ont surtout été étudiés chez le medaka. Aucun effet majeur n'a été rapporté pour des doses faibles. Chez les poissons femelles, un effet clair du DEHP sur la gonade femelle a été observé (baisse du niveau de vitellogénine, diminution forte du nombre d'ovocytes matures). En ce qui concerne la production d'embryons et les anomalies éventuelles, une diminution de taille des embryons produits ainsi qu'une augmentation de la mortalité ont été rapportés lors des traitements durant la phase embryonnaire.

Bibliographie

BARSE AV, CHAKRABARTI T, GHOSH TK, PAL AK, JADHAO SB. Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of Cyprinus carpio to diethyl phthalate. *Pest Biochem Physiol* 2007, **88** : 36-42

CARNEVALI O, TOSTI L, SPECIALE C, PENG C, ZHU Y, MARADONNA F. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *PLoS One* 2010, **5** : e10201

HARRIES JE, RUNNALLS T, HILL E, HARRIS CA, MADDIX S, et coll. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). *Environ Sci Technol*2000, **34** : 3003-3011

KIM EJ, KIM JW, LEE SK. Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environ Int* 2002, **28** : 359-365

LEE SK, VEERAMACHANENI DN. Subchronic exposure to low concentrations of di-n-butyl phthalate disrupts spermatogenesis in Xenopus laevis frogs. *Toxicol Sci* 2005, **84** : 394-407

LIN L, WANG Y, DING X, SONG W. Embryotoxicity of di-n-butyl phthalate to zebrafish (Brachydanio rerio) embryos. *Wei Sheng Yan Jiu* 2008,**37** : 278-280

METCALFE CD, METCALFE TL, KIPARISSIS Y, KOENIG BG, KHAN C, et coll. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (Oryzias latipes). *Environ Toxicol Chem* 2001, **20** : 297-308

NORMAN A, BÖRJESON H, DAVID F, TIENPONT B, NORRGREN L. Studies of uptake, elimination, and late effects in Atlantic salmon (Salmo salar) dietary exposed to Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) during early life. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007, **52** : 235-242

NOZAKA T, ABE T, MATSUURA T, SAKAMOTO T, NAKANO N, et coll. Development of vitellogenin assay for endocrine disrupters using medaka (Oryzias latipes). *Environ Sci* 2004, **11** : 99-121

OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, KLOAS W, JAGNYTSCH O, LUTZ I, et coll. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009, **364** : 2047-2062

OHTANI H, MIURA I, ICHIKAWA Y. Effects of dibutyl phthalate as an environmental endocrine disruptor on gonadal sex differentiation of genetic males of the frog Rana rugosa. *Environ Health Perspect* 2000, **108** : 1189-1193

ORTIZ-ZARRAGOITIA M, CAJARAVILLE MP. Effects of selected xenœogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005, **141** : 133-144

ORTIZ-ZARRAGOITIA M, TRANT JM, CAJARAVILLE MP. Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (Danio rerio). *Environ Toxicol Chem* 2006, **25** : 2394-2404

PATYNA PJ, BROWN RP, DAVI RA, LETINSKI DJ, THOMAS PE, et coll. Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006, **65** : 36-47

RALDUA D, ANDRE M, BABIN PJ. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **228** : 301-314

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

UREN-WEBSTER TM, LEWIS C, FILBY AL, PAULL GC, SANTOSEM. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat Toxicol* 2010, **99** : 360-369

WIBE AE, FJELD E, ROSENQVIST G, JENSSEN BM. Postexposure effects of DDE and butylbenzylphthalate on feeding behavior in threespine stickleback. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004, **57** : 213-219

39
Effets épigénétiques

Plusieurs études rapportent des effets de divers phtalates (BBP, DBP, DEHP, MBP) et de leurs métabolites actifs (MEHP) sur l'expression de gènes impliqués dans des fonctions de reproduction et sur les profils de méthylation génomiques.

In vivo, une attention particulière a été portée à la dissection moléculaire des effets anti-stéroïdiens connus des phtalates à forte dose. Ainsi, une exposition *in utero* à des doses de 100 à 950 mg/kg/j de DEHP en seconde moitié de gestation réduit le taux d'expression du récepteur stéroïdien nucléaire MR (*mineralocorticoid receptor*) et de ses cibles dans les cellules de Leydig d'animaux analysés dès la naissance, mais aussi à l'âge adulte (60 jours) (Martinez-Arguelles et coll., 2009). Cette persistance à 60 jours d'une réduction de l'expression de MR est associée à des anomalies des profils de méthylation du promoteur de ce gène mais cependant dans le sens inattendu d'une perte de méthylation. Malgré cette ambiguïté, les auteurs suggèrent que la baisse de production de testostérone associée à une exposition forte aux phtalates pourrait être médiée par des effets épigénétiques ciblant le récepteur stéroïdien MR. Une autre étude montre que la cryptorchidie pourrait augmenter la susceptibilité du testicule fœtal à une exposition au DBP (Johnson et coll., 2008). Il s'agit là d'un modèle intéressant d'étude des effets synergiques gène/environnement sur l'apparition de malformations du tractus génital mâle.

Une autre étude des effets potentiels épigénétiques des phtalates a été réalisée après suplémentation chez la souris à 20 000 mg de DBP par kg de nourriture pendant 6 jours (Ge et coll., 2002). Une hypométhylation du proto-oncogène *c-myc* a été observée dans le foie des animaux exposés, sans pourtant induire de modification d'expression de ce gène. Ceci pose donc la question de l'impact biologique d'une telle observation. L'effet sur *c-myc* a été plus récemment confirmé chez le rat, où une exposition à des doses plutôt fortes de DBP (1 800 mg/kg/j) induit aussi une déméthylation rapide du gène *c-myc* et semble précéder le phénotype d'hyperprolifération du foie (Kostka et coll., 2010). Le niveau d'expression de *c-myc* n'a cependant pas été analysé. Le rapport entre exposition aux phtalates, anomalies de méthylation et carcinogenèse a été étudié par d'autres équipes. Cependant, Pogribny et coll. (2008) ne détectent pas de différences du statut global de méthylation des cellules de foie d'animaux exposés au DEHP (1,2 % (w/w)), alors qu'il existe une baisse

significative de méthylation après exposition à d'autres proliférateurs du peroxysome tels que WY-14,643.

Ces premières analyses des effets potentiels des phtalates sur le statut de méthylation d'un organe métabolique, le foie, ont été suivies d'une étude plus directement liée aux fonctions reproductives, ciblée sur le testicule. L'effet du DEHP en exposition prénatale sur le taux global de méthylation testiculaire a fait l'objet de deux publications, d'après des études menées par le groupe de G. Wei (Wu et coll., 2010a et b). L'exposition a été réalisée par gavage à 500 mg/kg/j de femelles en seconde moitié de gestation (de 12 à 19 jpc – jours *post coïtum* –) et les testicules de souriceaux ont été analysés au jour 19 de gestation, et suivis à divers stades postnatals (3, 21, 56 et 90 jpp – jours *post partum* –). En réaction rapide après l'exposition, des taux augmentés de méthylation sont détectés à 19 jpc et 3 jpp, mais ces différences sont perdues à des stades plus tardifs (21, 56 et 90 jpp). Bien que l'augmentation précoce soit corrélée à une augmentation de deux fois le niveau d'expression des ADN-méthyltransférases responsables de la mise en place (Dnmt3A et Dnmt3B) et du maintien (Dnmt1) des profils de méthylation, l'augmentation du taux de méthylation reste peu significative par rapport à des animaux témoins (de 3,35 à 3,82 %). Des réductions du niveau d'expression du taux de testostérone sont observées en phase précoce et perdurent également à des stades plus tardifs, en accord avec les effets de dysgenèse testiculaire induite par le DEHP. Gray et coll. (2009) ne montrent pas si les diverses anomalies de différenciation sexuelle induites par le DEHP sont transmises aux générations suivantes non exposées et donc si les phtalates sont susceptibles d'engendrer des aberrations épigénétiques héréditaires.

En conclusion, les études menées sur les effets épigénétiques des phtalates (DEHP, DBP) en reproduction sont plutôt anecdotiques en termes de nombre et ne permettent pas de se forger une opinion tranchée. De plus, *in vivo*, des résultats contradictoires existent entre les effets que les phtalates peuvent avoir *in utero* sur des tissus à fonction reproductive, et des tissus avec des fonctions métaboliques, comme le foie.

BIBLIOGRAPHIE

GE R, TAO L, KRAMER PM, CUNNINGHAM ML, PEREIRAMA. Effect of peroxisome proliferators on the methylation and protein level of the c-myc protooncogene in B6C3F1 mice liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2002, **16** : 41-47

GRAY LE, JR., BARLOW NJ, HOWDESHELL KL, OSTBY JS, FURR JR, et coll. Transgenerational effects of di (2-ethylhexyl) phthalate in the male crl: cd(sd) rat: added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicol Sci* 2009, **110** : 411-425

HOKANSON R, HANNEMAN W, HENNESSEY M, DONNELLY KC, MCDONALD T, et coll. DEHP, bis(2)-ethylhexyl phthalate, alters gene expression in human cells: possible correlation with initiation of fetal developmental abnormalities. *Hum Exp Toxicol* 2006, **25** : 687-695

JOHNSON KJ, MCCAHAN SM, SI X, CAMPION L, HERRMANN R, et coll. The orl rat with inherited cryptorchidism has increased susceptibility to the testicular effects of in utero dibutyl phthalate exposure. *Toxicol Sci* 2008, **105** : 360-367

KANGSC, LEE BM. DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2005, **68** : 1995-2003

KOSTKA G, URBANEK-OLEJNIK K, WIADROWSKA B. Di-butyl phthalate-induced hypomethylation of the c-myc gene in rat liver. *Toxicol Ind Health* 2010, **26** : 407-416

MARTINEZ-ARGUELLES DB, CULTY M, ZIRKIN BR, PAPADOPOULOS V. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. *Endocrinology* 2009, **150** : 5575-5585

OHNO S, YUKINAWA F, NODA M, NAKAJIN S. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces NR4A subfamily and GIOT-1 gene expression, and suppresses CYP19 expression in human granulosa-like tumor cell line KGN. *Toxicol Lett* 2009, **191** : 353-359

POGRIBNY IP, TRYNDYAK VP, BOUREIKO A, MELNYK S, BAGNYUKOVA TV, et coll. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res* 2008, **644** : 17-23

WANG Y, SONG L, HONG X, CUI L, ZHANG Z, et coll. Low concentrations mono-butyl phthalate stimulates steroidogenesis by facilitating steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse Leydig tumor cells (MLTC-1). *Chem Biol Interact* 2006, **164** : 15-24

WU S, ZHU J, LI Y, LIN T, GAN L, et coll. Dynamic epigenetic changes involved in testicular toxicity induced by di-2-(ethylhexyl) phthalate in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010a, **106** : 118-123

WU S, ZHU J, LI Y, LIN T, GAN L, et coll. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression. *Int J Toxicol* 2010b, **29** : 193200

40
Mécanismes d'action

De nombreux résultats semblent indiquer que les récepteurs nucléaires PPAR (*peroxysome proliferator activated receptor*) sont des cibles privilégiées des phtalates chez les mammifères. Chez les poissons téléostéens ou chez les amphibiens, un certain nombre de pistes et notamment les gènes induits après une exposition à certains phtalates (DEHP), sont cohérents avec un effet possible via les PPAR mais cela n'est pas encore été étayé directement par des résultats tangibles.

Principales cibles des phtalates chez les mammifères

Les cibles principales des phtalates parmi les récepteurs nucléaires sont les récepteurs PPAR α et γ. Les récepteurs des œstrogènes α et β, le récepteur des androgènes, les récepteurs des xénobiotiques CAR (*constitutive activated receptor*) et PXR (*pregnan X receptor*) ont été également identifiés comme des médiateurs possibles des effets de ces molécules.

Récepteurs PPAR

Les phtalates les plus actifs sur les récepteurs PPAR sont le DEHP et son métabolite le MEHP, le BBP, le dibutylbenzyl-phtalate (DBBP) et le DIBP.

Le groupe de recherche de W. Whali (un des spécialistes mondiaux des PPAR) a récemment étudié les effets du MEHP sur les récepteurs PPAR γ et α (Desvergne et coll., 2009). Cette équipe a démontré que le MEHP était un agoniste partiel de PPARγ (SnuRM ou SPPARM pour *selective PPAR modulator*) (Feige et coll., 2007) et que son activité était plus faible sur le PPARγ de souris que sur le PPARγ humain. La nature agoniste partielle du MEHP a été confirmée par le fait que PPARγ interagit différemment avec des coactivateurs de récepteurs nucléaires selon qu'il est lié à la rosiglitazone ou au MEHP. Cependant, dans un modèle de lignée cellulaire humaine, le MEHP induit l'adipogénèse à une dose à peine 100 fois plus élevée que la rosiglitazone, le ligand de référence pharmaceutique de PPARγ.

Le groupe de W. Whali a également montré que le MEHP en interagissant avec PPARα induisait une carcinogenèse hépatique chez la souris (Feige et

coll., 2010). Dans cette étude, ils ont montré que le MEHP n'entraînait pas d'obésité chez la souris. Ce manque d'effet obésogène chez les rongeurs pourrait être dû au fait que l'activation de PPARα provoque l'oxydation hépatique des acides gras. En revanche, dans les souris exprimant un PPARα humain, l'obésité est observée car le DEHP (ou son métabolite actif le MEHP) n'induit pas l'oxydation hépatique. Ces différences d'effets observés entre PPARα murin et humain au niveau de l'oxydation hépatique pourraient être dues à la nature d'agoniste partiel du MEHP.

Autres cibles

Des résultats contradictoires ont été obtenus en fonction du composé (MEHP ou DiBP) sur l'expression du gène de l'aromatase dans l'ovaire. La transcription de celui-ci pouvant être activée ou réprimée et aboutir à une augmentation ou une diminution des œstrogènes (LoveKamp-Swan et coll., 2003 ; Boberg et coll., 2008). Cet effet pourrait être relayé par un des récepteurs PPAR (Latini et coll., 2008). Cependant, des travaux récents ont indiqué que l'effet des phtalates sur les enzymes de la stéroïdogenèse ne passait pas uniquement par PPAR mais pourrait être partiellement médié par le récepteur nucléaire CAR et éventuellement PXR (DeKeyser et coll., 2009 ; Eveillard et coll, 2009 ; Ren et coll., 2010). Dans le testicule fœtal de souris en culture avec ou sans LH (13,5 et 18,5 jpc), le MEHP inhibe fortement l'expression de *Cyp19A1*, le gène de l'aromatase (Lehriaki et coll., 2009). Cet effet n'est pas corrélé avec la synthèse de testostérone et la production d'œstrogène n'a pas été dosée dans ce modèle, ni l'implication des PPAR recherchée.

Parmi les récepteurs nucléaires, les récepteurs des œstrogènes (ER) et des androgènes (AR) sont également des cibles des phtalates (figure 40.1). En effet, les phtalates sont des activateurs de faible affinité des récepteurs des œstrogènes (Ghisari et coll., 2009) et des anti-androgènes de très faible affinité *in vitro* (Stroheker et coll., 2005 ; Kruger et coll., 2008) et *in vivo* (Jarfelt et coll., 2005).

En résumé, la perturbation endocrine des phtalates semble être majoritairement due à leur activité d'agonistes des récepteurs PPAR (alpha et gamma). L'effet majeur des phtalates pourrait être une inhibition de l'expression de l'aromatase médiée majoritairement par l'intermédiaire des récepteurs PPAR. Cet effet antiœstrogénique peut être partiellement compensé par l'activation des récepteurs des œstrogènes et au contraire potentialisé par l'inhibition du récepteur des androgènes.

Il est intéressant de constater que les cibles des phtalates sont (pour certaines) différentes de celles du bisphénol A. Ce constat renforce l'hypothèse que la perturbation endocrine pourrait résulter de l'action d'un cocktail de molécules agissant sur de nombreuses cibles.

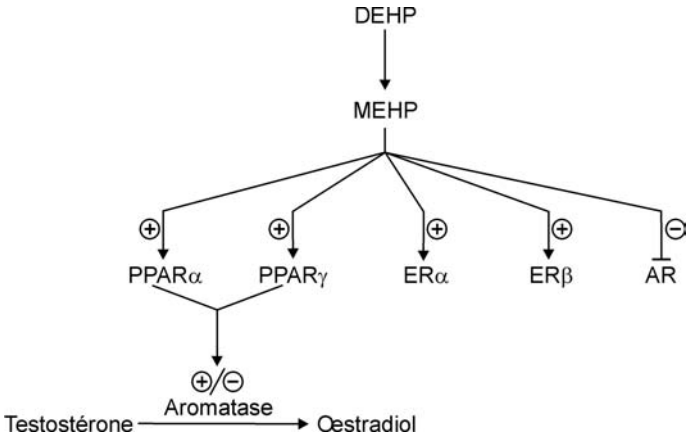


Figure 40.1 : Cibles des phtalates

Cibles chez les poissons téléostéens et chez les amphibiens

Plusieurs articles suggèrent une régulation de plusieurs enzymes du métabolisme par les phtalates chez diverses espèces (voir par exemple Ortiz-Zarragoitia et coll., 2006), de façon tout à fait cohérente via les PPAR mais le lien direct n'est pas encore fait et c'est à l'évidence une direction de recherche très prometteuse.

Trois types de récepteurs nucléaires différents ont fait l'objet d'investigations quant à leur rôle éventuel de médiateurs des effets des phtalates dans les espèces aquatiques : les récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR) et des hormones thyroïdiennes (TR). Il faut noter que d'autres cibles, notamment vis-à-vis de récepteurs membranaires comme le récepteur GABA, ont été récemment évoquées chez le xénope sans qu'aucune confirmation ne soit venue renforcer ces données préliminaires (Yang et coll., 2007).

En ce qui concerne la liaison avec les récepteurs des œstrogènes, de nombreuses données suggèrent que les phtalates sont faiblement œstrogéniques chez les poissons téléostéens et les amphibiens. La capacité de plusieurs phtalates (DEHP et BBP) à déplacer le ligand naturel (17β-œstradiol) marqué du ERα de truite a été mise en évidence dès 1995 par Jobling et coll. (1995). Cet effet est visible à des concentrations élevées d'au moins 50 µM. Un effet similaire a été observé chez le xénope pour le DEP (Lutz et Kloas, 1999) et pour le DBP sur le récepteur ERα de vairon (*Pimephales promelas*) (Rider et coll., 2009). De façon cohérente avec ces données suggérant une faible interaction avec les récepteurs des œstrogènes, le BBP a été démontré capable de se fixer faiblement à la protéine de transport des stéroïdes (*sex-steroid binding protein*) de la truite arc-en-ciel.

Un certain nombre d'indications suggèrent une capacité des phtalates à induire l'expression de la vitellogénine chez les poissons ou les amphibiens, ce qui est un test classique d'effet œstrogénique mais ces données indiquent toutes un effet assez faible voire franchement négatif (Harries et coll., 2000 ; Metcalfe et coll., 2001 ; Nozaka et coll., 2004 ; Nomura et coll., 2006 ; Barse et coll., 2007). Si une interaction entre les phtalates et les récepteurs des œstrogènes semble pouvoir être mise en évidence *in vitro*, sa pertinence *in vivo* est loin d'être démontrée. De fait, Legler et coll. (2002) en utilisant une lignée transgénique de zebrafish de type ERE-Luc concluent que le DEHP n'a pas d'activité œstrogénique significative *in vivo*.

En ce qui concerne les androgènes, même si les phtalates semblent avoir un effet à plusieurs niveaux sur le métabolisme des hormones stéroïdes, notamment au niveau de l'aromatase (Thibaut et Porte, 2004 ; Patyna et coll., 2006 ; Ortiz-Zarragoitia et coll., 2006), aucune donnée ne vient étayer la thèse d'une fixation directe de l'un des phtalates sur les récepteurs des androgènes de poissons téléostéens ou sur celui des amphibiens. Des données de modélisation structurale *in silico* suggèrent que cela pourrait être possible pour le BBP mais elles n'ont reçu à ce jour aucune confirmation expérimentale (Wu et coll., 2010).

En ce qui concerne une interaction possible avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes, il a été montré que le BBP est capable d'interférer avec la fixation de la T3 sur la transthyrétine de caille (Ishihara et coll., 2003). Les données de Sugiyama et coll. (2005) chez le xénope suggèrent que plusieurs phtalates (DCHP, BBP, DBP) montrent une action antagoniste *in vivo* sur une réponse aux hormones thyroïdiennes à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 µM. Ces molécules sont également capables de diminuer l'activité du récepteur TRβ induite par la T3 ce qui pourrait suggérer que les TR sont des cibles des phtalates même si à notre connaissance une fixation directe n'est pas encore démontrée.

Une expérience récente de *microarrays* menée chez la carpe a permis de mettre en évidence les gènes régulés dans le foie suite à une exposition au DBP (Moens et coll., 2006). De façon intéressante, le profil de gène régulé par cette molécule est distinct des 13 autres molécules testées (ligands naturels et divers perturbateurs endocriniens) ce qui suggère que le mode d'action des phtalates est bien distinct de celui de ces autres molécules, et notamment des xéno-œstrogènes classiques. Dans une analyse de *clustering*, les effets du DBP sont en fait rapprochés de ceux des hormones thyroïdiennes, ce qui renforce la notion que les TR pourraient être des cibles intéressantes. Notons toutefois qu'aucun ligand des PPAR n'a été intégré dans cette expérience et que cette cible, reste, au vu des données disponibles chez les mammifères, la plus crédible actuellement.

En conclusion, l'ensemble de la bibliographie étudiée indique que les récepteurs nucléaires PPAR sont les cibles privilégiées des phtalates. Cependant, les phtalates sont également capables d'activer les récepteurs des œstrogènes et d'inhiber le récepteur des androgènes. Les différents pthalates n'ont pas le même profil d'interaction avec les différents récepteurs nucléaires. Ainsi, le MEHP est essentiellement actif sur PPARγ et n'interagit pas avec les récepteurs ER. Au contraire, le BBP ou le DBP sont actifs sur les ER et interagissent très peu avec PPARγ. Des études *in vivo* sur des modèles de souris *Knock Out* (déficientes) pour un ou plusieurs de ces récepteurs mériteraient d'être réalisées avec des phtalates de profil différent (MEHP *versus* BBP par exemple).

Bibliographie

BARSE AV, CHAKRABARTI T, GHOSH TK, PAL AK, JADHAO SB. Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of Cyprinus carpio to diethyl phthalate. *Pest Biochem Physiol* 2007, **88** : 36-42

BOBERG J, METZDORFF S, WORTZIGER R, AXELSTAD M, BROKKEN L, et coll. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 2008, **250** : 75-81

DEKEYSER JG, STAGLIANO MC, AUERBACH SS, PRABHU KS, JONES AD, OMIECINSKI CJ. Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Mol Pharmacol* 2009, **75** : 1005-1013

DESVERGNE B, FEIGE JN, CASALS-CASAS C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* 2009, **304** : 43-48

EVEILLARD A, LASSERRE F, DE TAYRAC M, POLIZZI A, CLAUS S, et coll. Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, **236** : 282-292

FEIGE JN, GELMAN L, ROSSI D, ZOETE V, MÉTIVIER R, et coll. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 2007, **282** : 19152-19166

FEIGE JN, GERBER A, CASALS-CASAS C, YANG Q, WINKLER C et coll. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 234-241

GHISARI M, BONEFELD-JORGENSEN EC. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol Lett* 2009, **189** : 67-77

ISHIHARA A, NISHIYAMA N, SUGIYAMA S, YAMAUCHI K. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen Comp Endocrinol* 2003, **134** : 36-43

JARFELT K, DALGAARD M, HASS U, BORCH J, JACOBSEN H, LADEFOGED O. Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reprod Toxicol* 2005, **19** : 505-515

JOBLING S, REYNOLDS T, WHITE R, PARKER MG, SUMPTER JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 582-587

KRUGER T, LONG M, BONEFELD-JORGENSEN EC. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 2008, **246** : 112-123

LATINI G, SCODITTI E, VERROTTI A, DE FC, MASSARO M. Peroxisome proliferator-activated receptors as mediators of phthalate-induced effects in the male and female reproductive tract: epidemiological and experimental evidence. *PPAR Res* 2008, **2008** : 359267

LEGLER J, ZEINSTRA LM, SCHUITEMAKER F, LANSER PH, BOGERD J, et coll. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 2002, **36** : 4410-4415

LEHRAIKI A, RACINE C, KRUST A, HABERT R, LEVACHER C. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 372-382

LOVEKAMP-SWAN T, JETTEN AM, DAVISBJ. Dual activation of PPARalpha and PPARgamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003, **201** : 133-141

LUTZ I, KLOAS W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci Total Environ* 1999, **225** : 49-57

METCALFE CD, METCALFE TL, KIPARISSIS Y, KOENIG BG, KHAN C, et coll. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (Oryzias latipes). *Environ Toxicol Chem* 2001, **20** : 297-308

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

NOMURA Y, MITSUI N, BHAWAL UK, SAWAJIRI M, TOOI O, et coll. Estrogenic activity of phthalate esters by in vitro VTG assay using primary-cultured Xenopus hepatocytes. *Dent Mater J* 2006, **25** : 533-537

NOZAKA T, ABE T, MATSUURA T, SAKAMOTO T, NAKANO N, et coll. Development of vitellogenin assay for endocrine disrupters using medaka (Oryzias latipes). *Environ Sci* 2004, **11** : 99-121

ORTIZ-ZARRAGOITIA M, TRANT JM, CAJARAVILLE MP. Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (Danio rerio). *Environ Toxicol Chem* 2006, **25** : 2394-2404

PATYNA PJ, BROWN RP, DAVI RA, LETINSKI DJ, THOMAS PE, et coll. Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006, **65** : 36-47

REN H, ALEKSUNES LM, WOOD C, VALLANAT B, GEORGE MH, et coll. Characterization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {alpha} (PPAR{alpha}) - Independent Effects of PPAR{alpha} Activators in the Rodent Liver: Di-(2-ethylhexyl) phthalate Also Activates the Constitutive Activated Receptor. *Toxicol Sci* 2010, **113** : 45-59

RIDER CV, HARTIG PC, CARDON MC, WILSONVS. Comparison of chemical binding to recombinant fathead minnow and human estrogen receptors alpha in whole cell and cell-free binding assays. *Environ Toxicol Chem* 2009, **28** : 2175-2181

STROHEKER T, CABATON N, NOURDIN G, REGNIER JF, LHUGUENOT JC, et coll. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicology* 2005, **208** : 115-121

SUGIYAMA S, SHIMADA N, MIYOSHI H, YAMAUCHI K. Detection of thyroid system-disrupting chemicals using in vitro and in vivo screening assays in Xenopus laevis. *Toxicol Sci* 2005, **88** : 367-374

THIBAUT R, PORTE C. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **92** : 485-494

WU B, FORD T, GU JD, ZHANG XX, LI AM, CHENG SP. Computational studies of interactions between endocrine disrupting chemicals and androgen receptor of different vertebrate species. *Chemosphere* 2010, **80** : 535-541

YANG L, MILUTINOVIC PS, BROSNAN RJ, EGEREI 2ND, SONNER JM. The plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate modulates gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor function. *Anesth Analg* 2007, **105** : 393-396

41
Relation structure-fonction et études *in silico*

Au cours de ces dernières années, des articles sont apparus dans la littérature concernant l'étude de la toxicité des phtalates par des méthodes SAR (*structure-activity relationship*) et QSAR (*quantitative structure-activity relationship*) (Netzeva et coll., 2005 et 2006). Les « *end points* » typiques de la toxicité ou de l'écotoxicité comme la solubilité dans l'eau ou le coefficient de partition eau/octanol ont été considérés (Thomsen et coll., 1999).

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études dédiées complètement aux relations entre la structure des phtalates et leurs interactions avec les récepteurs endocriniens. Deux articles de Tong et de ses collaborateurs (Fang et coll., 2001 et 2003) rapportent une analyse détaillée de l'activité anti-androgénique d'environ deux cent substances chimiques dont sept phtalates (Fang et coll., 2003). L'activité est mesurée en termes de compétition vis-à-vis d'un agoniste synthétique (R1881) pour le site du récepteur aux androgènes (AR). Les phtalates testés présentent *in vitro*, une affinité relative (*relative binding affinity*, RBA) de liaison au récepteur AR modérée, voire basse, par rapport aux stéroïdes (RBA moyenne de 0,0045 *versus* 14,7 pour les stéroïdes) (Fang et coll., 2003). Comme pour les ligands du récepteur ER, deux points d'ancrage sont nécessaires pour avoir une forte interaction (type liaison hydrogène) avec le récepteur AR, et donc une activité anti-androgénique importante (figure 41.1). En absence de ces caractéristiques chimiques, seules les interactions hydrophobes permettent une interaction avec le récepteur. Ceci est le cas de phtalates testés, où le cycle aromatique peut être impliqué dans ce type d'interaction (Nakai et coll., 1999 ; Fang et coll., 2003). Éventuellement, un deuxième cycle benzénique, lié sur une chaîne latérale et à distance de trois atomes de carbone du cycle principal, comme dans le BBP, pourrait renforcer cette interaction (Fang et coll., 2001). Le niveau modeste de cette interaction explique les faibles activités *in vitro* (Fang et coll., 2003).

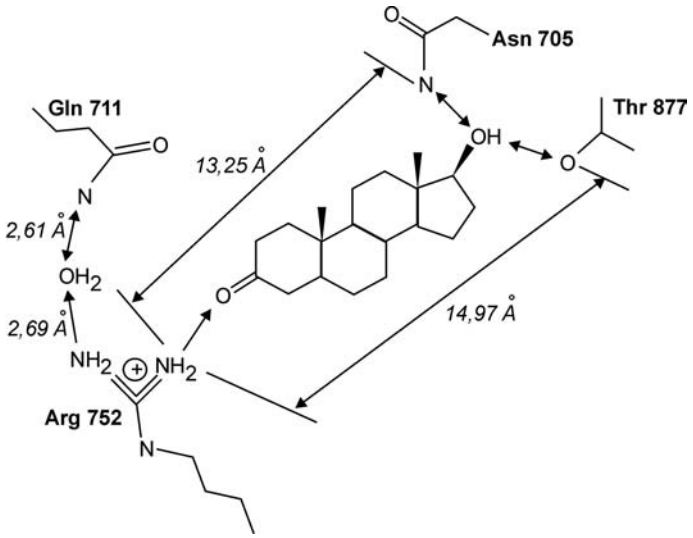


Figure 41.1 : Réseau des liaisons hydrogène dans l'interaction du récepteur AR avec le dihydrotestostérone (Fang et coll., 2003)

Dans leur étude datant de l'année 2003, Klopman et Chakravarti ont considéré 313 produits chimiques classés comme actifs ou non actifs pour développer un modèle SAR (Klopman et Chakravarti, 2003). Dans les douze phalates considérés, un a été classé comme actif, le n-butylbenzylphtalate diester et un autre le DBP comme faiblement actif. Cette classification a été faite en termes de RBA *in vitro* sur la base du travail de Tong et de ses collaborateurs (Fang et coll., 2001).

Dans une étude plus récente (Li et coll., 2009), l'activité œstrogénique, caractérisée par la concentration du phtalate à la moitié de la concentration maximale effective (EC50) par rapport à celle du ligand naturel E2, du BBP et du di-propylphtalate est calculée avec une erreur moyenne de 35 %. Un modèle QSAR fiable et robuste (R2=0,90 et Q2LOO=0,90) a été ensuite développé sur la base de 25 œstrogènes (dont les deux phtalates) et validé sur 8 œstrogènes. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer à partir de ce modèle, un mécanisme sous-jacent concernant l'interaction spécifique phtalate-récepteur.

En conclusion, les études actuelles sur les interactions entre les phtalates et les récepteurs ER ou AR sont insuffisantes. Une faible affinité a été mise en évidence avec le récepteur AR pour le BBP, renforcée par la présence d'un double cycle benzénique.

Bibliographie

FANG H, TONG W, SHI LM, BLAIR R, PERKINS R, et coll. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 2001, **14** : 280-294

FANG H, TONG WG, BRANHAM WS, MOLAND CL, DIAL SL, et coll. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem Res Toxicol* 2003, **16** : 1338-1358

KLOPMAN G, CHAKRAVARTI SK. Structure-activity relationship study of a diverse set of estrogen receptor ligands (I) using MultiCASE expert system. *Chemosphere* 2003, **51** : 445-459

LI F, CHEN J, WANG Z, LI J, QIAO X. Determination and prediction of xenœogens by recombinant yeast-based assay and QSAR. *Chemosphere* 2009, **74** : 1152-1157

NAKAI M, TABIRA Y, ASAI D, YAKABE Y, SHIMYOZU T, et coll. Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **254** : 311-314

NETZEVA TI, APTULA AO, BENFENATI E, CRONIN MTD, GINI G, et coll. Description of the electronic structure of organic chemicals using semiempirical and ab initio methods for development of toxicological QSARs. *J Chem Inf Model* 2005, **45** : 106-114

NETZEVA TI, GALLEGOS SALINER A, WORTH AP. Comparison of the applicability domain of a quantitative structure-activity relationship for estrogenicity with a large chemical inventory. *Env Tox Chem* 2006, **25** : 1223-1230

THOMSEN M, RASMUSSEN AG, CARLSEN L. SAR/QSAR approaches to solubility, partitioning and sorption of phthalates. *Chemosphere* 1999, **38** : 2613-2624

42
Conclusions et perspectives de recherche

Les phtalates (ou esters phtaliques) sont largement utilisés en raison de leur propriété plastifiante. Ils sont présents dans de très nombreux produits d'usage courant. La particularité des phtalates est de ne pas se lier de manière covalente aux polymères auxquels ils donnent leur souplesse et donc d'être relâchés facilement dans le milieu environnant. Ainsi l'exposition humaine aux phtalates est relativement ubiquiste, les voies d'absorption pouvant être l'inhalation, l'ingestion et la voie percutanée. La principale source d'exposition pour le DEHP, le DBP et le DIBP est alimentaire. Les enfants présentent des concentrations plus importantes que les adultes. Les dispositifs médicaux représentent une exposition notable pour certaines populations. La demi-vie de ces composés est de 8 h à 48 h mais la continuité de l'exposition a pour conséquence un maintien de l'imprégnation de l'organisme. Certains phtalates ou leurs métabolites sont retrouvés, chez l'homme, dans les urines, le plasma sanguin, le plasma séminal, le lait maternel, le liquide amniotique et le sang du cordon. Le dosage des métabolites dans ces milieux permet d'exclure une contamination liée aux matériels de prélèvements.

Les études réalisées chez l'Homme, diverses en ce qui concerne leur méthodologie, témoignent d'une exposition relativement généralisée. Elles se sont intéressées à la femme enceinte et au nouveau-né, à la femme et l'homme adultes. La mise en évidence d'une diminution de la distance anogénitale chez le nourrisson masculin, en relation avec un taux de phtalates et de métabolites élevé chez la mère à 29 semaines de gestation, suggère un déficit d'androgénisation durant le développement fœtal. Chez l'homme adulte, la majorité des études montre un lien entre taux de phtalates et altérations de certaines caractéristiques du sperme avec une possible altération de l'ADN du spermatozoïde. Par ailleurs, une étude a mis en évidence chez des travailleurs fortement exposés une diminution de la testostérone. Les études chez la femme, moins nombreuses, ne permettent pas de proposer des conclusions quant à un effet des phtalates sur la fonction ovarienne, l'endométriose ou la puberté.

Chez le rat mâle, les phtalates sont à l'origine d'atteintes de l'appareil et de la fonction de reproduction notamment lorsque l'exposition est présente durant la gestation et/ou la période néonatale. Les phtalates inhibent la gamétogenèse et la stéroïdogenèse chez le mâle particulièrement lors de l'exposition

fœtale, postnatale ou pubertaire. Chez les animaux femelles, des effets sont décrits à des doses élevées sur les ovaires et l'utérus. La production d'œstradiol peut être affectée. Chez le primate non humain, les effets semblent moins marqués soulignant ainsi des variations interespèces en relation avec les différences des métabolismes. Chez le poisson, les phtalates ont également des effets sur l'appareil et la fonction de reproduction. Chez le zebrafish, une action des phtalates sur le développement embryonnaire a été mise en évidence. Enfin, *in vitro* les effets délétères des phtalates sur le testicule, plus précisément sur les cellules de Sertoli et les cellules germinales, apparaissent réels. L'ovaire est également un organe cible pour les phtalates.

Tant chez l'animal que chez l'homme, l'exposition aux phtalates semble avoir pour conséquences des altérations de certains paramètres de la fonction de reproduction et ce particulièrement si cette exposition se situe à des périodes sensibles comme la vie intra-utérine et la période néonatale. Il existe cependant des différences entre les espèces posant la question du bon modèle expérimental représentatif des effets chez l'Homme. Compte tenu de l'exposition relativement ubiquiste aux phtalates, il est important, même si toutes les études ne sont pas démonstratives, de prendre en compte les altérations décrites et de limiter l'exposition notamment durant les périodes les plus sensibles. Certains phtalates ont été déjà interdits ou réduits dans leurs usages.

À défaut de pouvoir supprimer toute exposition aux phtalates, il paraît indispensable de poursuivre les études épidémio-cliniques tant durant la grossesse que chez le nouveau-né et l'adulte. Ces études devront s'appuyer sur de réelles mesures d'exposition, sur des indicateurs d'effets validés et standardisés et sur des populations bien identifiées. Par ailleurs, ce type d'études ne doit pas faire l'impasse sur les multi-expositions et donc intégrer de multiples paramètres.

VII

Retardateurs de flamme polybromés (RFB)

Introduction

La production et l'utilisation de substances chimiques à fonction de retardateurs de flamme ont débuté au milieu du XXe siècle, afin de limiter l'inflammabilité de certains matériaux combustibles, via une diminution du risque de départ de feu et/ou un freinage du processus de combustion. Il existe aujourd'hui de nombreux types de retardateurs de flamme, agissant soit par voie chimique soit par voie physique, ceux-ci étant incorporés dans les produits et matériaux concernés (textiles, rideaux, vêtements, sièges, plastiques, mousses, capitonnages, résines, circuits imprimés, câbles, téléviseurs, ordinateurs...) à des teneurs allant en général de 5 à 20 %.

Les retardateurs de flamme bromés (RFB) représentent 30 % des retardateurs de flamme utilisés au niveau européen. Trois groupes chimiques dominent les usages courants (figure 1) : les polybromodiphényléthers (PBDE), le 1,2,5,6,9,10 hexabromocyclododécane (HBCD) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA).

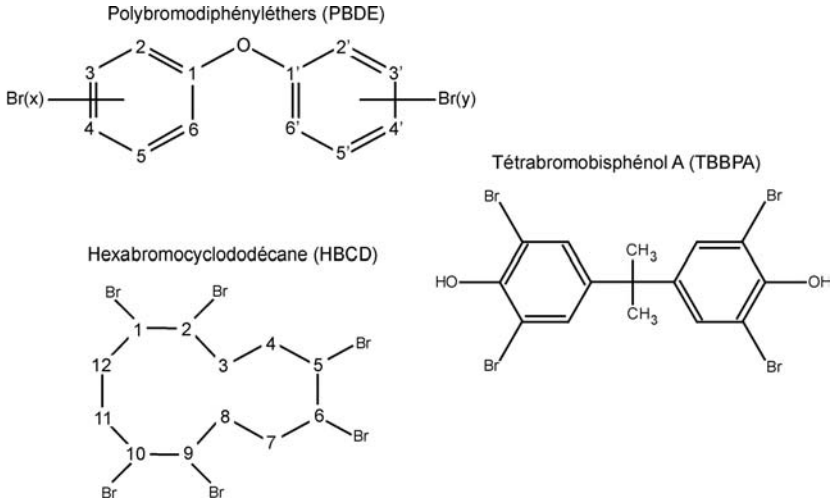


Figure 1 : Structures chimiques des principales familles de retardateurs de flamme bromés

Du point de vue de leur structure chimique, les PBDE sont des éthers aromatiques bicycliques. Leur classification suit le système IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) et s'appuie sur le nombre et la position des atomes de brome dans le cycle. Il en existe actuellement 209. Pour les différencier, la nomenclature usuelle consiste à les désigner par un nombre

donnant des informations sur le degré de bromation (nombre d'atomes de brome dans la molécule) et sur la position des atomes de brome sur les cycles benzéniques (Ballschmiter et coll., 1993). Par exemple, le 2,2',4,4',5-pentabromodiphényléther et le 2,2',4,4',6-pentabromodiphényléther, deux penta-BDE, sont identifiés comme BDE 99 et BDE 100. Le décabromodiphényléther, dernier de la série, est identifié comme BDE 209.

La réglementation européenne interdit depuis août 2004 deux mélanges « techniques » de PBDE historiquement utilisés industriellement (tableau I), à savoir l'octa-BDE et le penta-BDE (ou mélange DE-71), mais autorise encore le mélange déca-BDE (Directive 2002/95/EC de l'*European Parliament and of the Council* - 27 janvier 2003). Ce dernier est essentiellement composé de BDE 209, celui-ci pouvant se décomposer en congénères plus faiblement bromés par dégradation physique (notamment sous l'influence des rayonnements UV) (Kajiwara et coll., 2008).

Tableau I : Composition (en %) des trois mélanges de PBDE à usage industriel

Congénères	Penta-BDE	Octa-BDE	Déca-BDE
Tri-BDE	0–1		0,3–3
Tétra-BDE	24–38		
Penta-BDE	50–62	0–0,5	
Hexa-BDE	4–12	5,5–12	
Hepta-BDE		42,3–58	
Octa-BDE		26–36,1	
Nona-BDE		8–14	0,3–3
Déca-BDE		0–3	97–98

Les PBDE sont des retardateurs de flamme additifs. Ils ne sont pas liés aux matériaux par des liaisons chimiques, mais par un phénomène physique, et peuvent par conséquent faire l'objet d'un relargage depuis les matériaux dans certaines conditions. Ils agissent en empêchant les réactions radicalaires en phase gazeuse, et ralentissent ainsi la combustion voire l'alimentation de celle-ci en gaz inflammables.

Le TBBPA, quant à lui, a une structure chimique proche de celle du BPA, avec deux cycles aromatiques liés par un pont carbone. Contrairement aux PBDE, le TBBPA est un composé utilisé en tant que réactif dans les matériaux, donc avec une liaison forte à ceux-ci.

L'HBCD occupe la troisième place au classement des retardateurs de flamme bromés les plus utilisés. L'HBCD « technique » est un mélange principalement constitué de trois diastéréoisomères (composés identiques sauf sur le plan de la disposition spatiale de leurs atomes), à savoir l'alpha-, le bêta- et le gamma-HBCD, qui se répartissent dans la proportion d'environ 70 à 95 % de

γ-HBCD pour 5 à 30 % d'α- et de β-HBCD. Ces composés se caractérisent globalement par des propriétés physico-chimiques qui les rendent lipophiles et bioaccumulables, au même titre que certains polluants organiques persistants (POP) halogénés (dioxines, polychlorobisphényls).

La production de certains RFB (notamment les mélanges penta-BDE et octa-BDE précédemment mentionnés) a été stoppée dans certains pays dont l'Europe durant ces dernières années, en raison de la mise en évidence ou de la suspicion de certains éléments préoccupants pour la santé de l'homme. D'une part, et à l'inverse d'autres POP, leur présence s'est accrue ces dernières décennies dans l'environnement, dans la faune, mais également chez l'homme. D'autre part, différentes études ont fait état d'effets biologiques délétères consécutifs à une exposition aux RFB, en particulier sur des systèmes *in vitro* et/ou modèles animaux. La présence des RFB dans l'environnement immédiat et quotidien des populations des sociétés développées, via l'alimentation et de nombreux produits manufacturés, ainsi que leur caractère de « perturbateurs endocriniens » en font en particulier des substances retenant l'attention à la fois de la communauté scientifique, des pouvoirs publics et des consommateurs, ceci depuis environ le milieu des années 1990.

Bibliographie

BALLSCHMITER K, MENNEL A, BUYTEN J, FRESENIUS J. Long chain alkyl-polysiloxanes as non-polar stationary phases in capillary gas chromatography. *Anal Chem* 1993, **346** : 396-402

KAJIWARA N, NOMA Y, TAKIGAMI H. Photolysis studies of technical decabromodiphenyl ether (DecaBDE) and ethane (DeBDethane) in plastics under natural sunlight. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 4404-4409

43
Exposition des populations

Les produits alimentaires riches en lipides (viande, poisson, lait) contribuent de façon majeure à l'exposition de l'Homme aux RFB. Toutefois, les habitudes alimentaires très diverses d'un continent à l'autre expliquent une disparité observée en ce qui concerne les principaux contributeurs parmi ces produits.

Les voies d'exposition aérienne (par l'ingestion de poussières) et directe (par contact avec certains matériaux plastiques) représentent les secondes voies d'exposition principales de l'Homme aux RFB, ceci de façon d'autant plus significative pour les jeunes enfants et concernant les congénères les plus hautement bromés dont le décabromodiphényléther (BDE 209).

Sources et voies d'exposition aux PBDE

L'étude de Bakker et coll. (2008) s'est attachée à caractériser et évaluer l'apport alimentaire en PBDE pour la population générale aux Pays-Bas. Sur la base des données et des modèles de calcul utilisés, la valeur médiane haute estimée pour la somme de 5 congénères PBDE (47, 99, 100, 153 et 154) est de 0,79 ng/kg/j. La contribution du BDE 47 a été évaluée à environ 70 % de cette exposition. Les deux sources alimentaires principales identifiées à l'origine de cet apport sont les produits laitiers (39 %) et le poisson (28 %). Concernant la première source, il doit être rappelé que la consommation de lait aux Pays-Bas est historiquement significativement plus haute que dans les autres pays de l'Union Européenne. Concernant la seconde source, un parallèle peut être fait avec d'autres types de polluants organiques persistants lipophiles tels que les dioxines ou les PCB qui sont également retrouvés de façon préférentielle dans le poisson et en particulier chez les espèces présentant un fort taux de matière grasse. Les mêmes auteurs ont enfin rapporté une diminution significative de cet apport en fonction de l'âge considéré, avec des valeurs estimées pour le BDE 47 de 1,40, 0,43 et 0,30 ng/kg/j à 2, 10 et 40 ans, respectivement.

Fraser et coll. (2009) ont conduit une étude visant à identifier les principaux déterminants alimentaires des taux d'imprégnation plasmatiques en PBDE observés sur environ 1 900 sujets aux États-Unis. Après un ajustement des données sur un certain nombre de facteurs confondants tels que l'âge, le sexe,

l'origine ethnique ou encore l'indice de masse corporelle, les résultats montrent que les parties grasses de viande de volaille et de bœuf sont les principaux contributeurs de ces niveaux de contamination, à la fois sur la base de l'étude du bol alimentaire précis sur 24 heures et sur la base d'un questionnaire annuel de fréquence. Aucune association n'a en revanche été observée avec la consommation de poisson ou de produits laitiers, contrairement à l'étude précédente. Ce dernier résultat reflète très probablement les différences majeures de consommation entre les deux pays considérés.

L'étude de Bakker et coll. (2008) a également analysé les résultats d'autres études similaires réalisées au Canada (Ryan et coll., 2001), en Finlande (Kiviranta et coll., 2004), en Espagne (Bocio et coll., 2003), en Suède (Lind et coll., 2002) et au Royaume-Uni (Harrad et coll., 2004 ; *Food Standards Agency,* 2006), afin de dégager des valeurs moyennes d'exposition alimentaire totale aux PBDE des consommateurs. Les valeurs obtenues par ces différentes études pour la somme des mêmes 5 PBDE cités plus haut apparaissent globalement comprises entre 100 et 150 ng/j pour le Royaume-Uni, et entre 50 et 100 ng/j pour les autres pays considérés.

S'agissant des autres voies d'exposition, Chen et coll. (2009) ont déterminé les teneurs de PBDE tri- à déca-bromés dans un ensemble de 69 jouets fabriqués en Chine. Les résultats ont montré une présence de ces composés à une teneur cumulée médiane de 53 µg/g, le BDE 209 représentant environ 65 % de celle-ci. En accord avec l'usage industriel majoritairement tourné vers l'utilisation du mélange Déca-BDE, les congénères hautement bromés (octa- à déca-bromés) sont globalement les plus abondants au sein du profil général observé. Les teneurs apparaissent par ailleurs plus élevées pour les produits en plastique dur par rapport aux autres matériaux testés (plastiques tendres, mousses…). Ces valeurs relativement fortes sont toutefois inférieures aux limites réglementaires fixées au niveau européen pour ce type de produit (1 000 µg/g), sauf pour un des produits testés. Sur la base de ces données, les auteurs ont estimé l'exposition totale aux PBDE par contact avec ces produits manufacturés à 0,08 à 8,99 ng/kg/j pour les nourrissons de 3 mois et les enfants de 14 ans, respectivement, ce qui place cette voie d'exposition derrière la voie alimentaire lors des toutes premières années de vie mais devant celle-ci durant les années suivantes jusqu'à l'adolescence.

L'étude d'Imm et coll. (2009) s'est attachée à identifier les principales sources non alimentaires de PBDE dans une quarantaine de lieux d'habitation domestiques aux États-Unis. Les résultats obtenus par la mesure de brome ambiant par un système portable de détection aux rayons X montrent que les sièges automobiles et certains matériaux de literie apparaissent comme les principaux prédicteurs des niveaux d'imprégnation mesurés pour cette population de 29 hommes et 15 femmes. En revanche, les niveaux de PBDE déterminés dans les poussières et dans l'air ambiant ne sont pas apparus prédictifs de ces niveaux d'imprégnation.

La revue globale de Frederiksen et coll. (2009a) consacrée aux niveaux et différentes sources d'exposition humaine aux PBDE dégage plusieurs observations, parmi lesquelles une contribution majeure des produits alimentaires riches en lipides, de l'ingestion de poussières présentes dans l'atmosphère domestique, et du lait maternel. Elle constate également des niveaux d'exposition et d'imprégnation globalement plus élevés (d'un facteur d'environ 10) aux États-Unis par rapport aux autres pays pour lesquels des données sont disponibles, et des niveaux plus élevés au Royaume-Uni par rapport aux autres pays d'Europe.

Enfin, Herbstman et coll. (2007) se sont intéressés aux déterminants des taux de PBDE mesurés dans le sérum d'environ 300 sujets aux États-Unis. Les résultats ont montré que ces niveaux d'imprégnation étaient globalement plus faibles pour les enfants de mères asiatiques, mais plus élevés pour les enfants de mères fumeuses. Toutefois, même après ajustements, le risque de facteur confondant apparaît ici relativement important, impliquant de prendre ces résultats avec prudence. Par ailleurs, une non concordance des résultats obtenus pour les PBDE et les PCB également étudiés dans la même étude confirme l'existence de sources et voies d'exposition différentes pour ces deux familles de polluants organiques persistants.

Biomarqueurs d'exposition aux PBDE

Bradman et coll. (2007) ont déterminé les taux plasmatiques de 7 PBDE (47, 85, 99, 100, 153, 154 et 183) dans une population de 24 femmes enceintes d'origine mexicaine vivant dans une zone rurale et agricole de Californie. Les niveaux d'imprégnation observés, classiquement exprimés par rapport au taux de matière grasse de l'échantillon (c'est-à-dire par gramme de lipide) se situent entre 5,3 et 320 ng/g de lipide, avec une valeur médiane de 21 ng/g de lipide. Le BDE 47 est apparu comme le principal contributeur avec une valeur médiane de 11 ng/g de lipide, les BDE 99, 100, et 153 ayant également été détectés dans tous les échantillons mais à des niveaux sensiblement inférieurs. Le BDE 183 n'a en revanche été détecté que dans moins de 25 % des échantillons analysés. Les concentrations mesurées pour ces différents composés sont apparues significativement corrélées entre elles (R_{sp}=0,53–0,95 ; $p<0,05$), mais en revanche non corrélées avec les concentrations mesurées pour le PCB 153 également recherché dans la même étude. Ce dernier résultat confirme l'existence de sources d'exposition distinctes pour les retardateurs de flamme bromés par rapport aux autres polluants organiques persistants halogénés de type dioxines ou PCB. La mise en regard de ces niveaux d'imprégnation avec les éléments sociodémographiques relatifs aux sujets d'étude, après prise en compte à la fois du faible nombre de mesures et de l'influence de deux d'entre elles particulièrement élevées, n'a pas montré de façon claire et significative une association entre ces niveaux d'imprégnation

et le fait de travailler dans une exploitation agricole, l'indice de masse corporelle, le nombre d'enfants, le nombre de mois de lactation, la consommation de poisson, ou encore la durée d'implantation sur le territoire américain.

L'étude française d'Antignac et coll. (2009) a recherché 23 PBDE (28, 37, 47, 49, 75, 85, 99, 100, 118, 153, 154, 155, 183, 190, 196, 197, 201, 202, 203, 206, 207, 208, et 209) dans des échantillons de tissus adipeux, sérum et lait maternel ainsi que de sérum du cordon collectés chez une centaine de couples mère-enfant recrutés dans la région toulousaine dans le cadre d'accouchements sous césarienne. Les 7 PBDE majoritaires (tri- à -hepta-bromés) les plus couramment suivis (28, 47, 99, 100, 153, 154 et 183) ont été détectés dans tous les échantillons de tissus adipeux analysés, à des concentrations cumulées comprises entre 0,8 et 25,8 ng/g de lipide (valeurs moyenne et médiane de 4,1 et 2,6 ng/g de lipide, respectivement). Dans le sérum maternel, certains de ces mêmes congénères ont été détectés dans une plus faible proportion d'échantillons analysés (de 5 à 97 % selon le congénère considéré), leur concentration cumulée variant entre 0,1 et 22,9 ng/g de lipide (valeurs moyenne et médiane égales à 2,1 et 1,0 ng/g de lipide, respectivement). Ces dernières valeurs apparaissent significativement inférieures (d'un facteur 10 à 20 environ) à celles rapportées par l'étude précédente (Bradman et coll., 2007), en accord avec des niveaux d'imprégnation avérés plus importants aux États-Unis par rapport aux pays européens s'agissant de plusieurs classes de polluants chimiques environnementaux. Un autre élément apporté par cette étude est la présence de PBDE d'un degré de bromation supérieur (octa- à déca-bromés), à des teneurs cumulées du même ordre ou supérieures à celles déterminées pour les congénères précédents plus faiblement bromés (valeurs moyenne et médiane de 2,7 et 2,7 ng/g de lipide dans le tissus adipeux et de 13,4 et 8,8 ng/g de lipide dans le sérum maternel, respectivement). Ce dernier résultat montre en particulier l'intérêt de considérer ces derniers congénères octa- à déca-bromés dans le cadre de l'évaluation du risque associé à ces substances. Ceux-ci sont encore très rarement inclus dans les études malgré une contribution égale ou supérieure à 50 % de l'exposition globale humaine aux PBDE, principalement en raison d'un degré de difficulté encore supérieur sur le plan méthodologique.

Fängström et coll. (2005) ont déterminé les taux d'imprégnation plasmatiques de PBDE (47, 99, 100, 153, 154 et 209) dans une population (n=57 sujets) de femmes enceintes des îles Feroe sur la période 1994-1995, ainsi que dans le sang de leurs enfants (n=42 sujets) à l'âge de 7 ans (2000-2001). Les résultats obtenus montrent tout d'abord des niveaux de contamination significativement supérieurs à ceux observés par d'autres études, la médiane déterminée pour la somme des 5 PBDE suivis étant de 4,0 et 5,0 ng/g de lipide pour les mères et pour les enfants, respectivement. Ces niveaux élevés pourraient avoir pour origine la consommation traditionnelle d'espèces animales sauvages d'origine marine présentant des niveaux de contamination particulièrement importants. Si le BDE 47 est apparu majoritaire chez les mères, le BDE

153 s'est avéré le plus abondant chez les enfants. De plus, aucune corrélation significative n'est apparue entre les taux mesurés chez les mères et chez leurs enfants, suggérant pour ces derniers l'hypothèse de sources de contamination autres que celle du transfert fœtal ou via l'allaitement.

Tendances séculaires

L'étude suédoise de Fängström et coll. (2008) a étudié l'évolution temporelle des niveaux de PBDE et de HBCD dans des échantillons de lait maternel collectés sur la période 1980 à 2004, ces mesures ayant été réalisées sur 14 mélanges de 20 à 116 prélèvements individuels selon la période considérée. Les résultats obtenus montrent, pour les deux PBDE majoritaires (BDE 47 et BDE 153), un accroissement des niveaux d'imprégnation mesurée entre le début des années 1980 et la fin des années 1990 (d'un facteur 4 à 5), puis une tendance à la décroissance depuis le début des années 2000. En revanche, cette tendance à la diminution n'est pas observée pour l'HBCD qui, à l'inverse des mélanges industriels de PBDE (Penta- et octa-BDE), est toujours produit et utilisé.

Exposition fœtale

L'étude de Guvenius et coll. (2003) est une des premières à avoir rapporté, pour une population de 15 mères suédoises et pour la somme des congénères tri- à hepta-bromés, des valeurs médianes de 2,1 et 1,7 ng/g de lipide dans le sérum maternel et du cordon, respectivement (tableau 43.I).

Gomara et coll. (2007) se sont également intéressés à l'exposition du fœtus et du nourrisson aux PBDE dans une population espagnole, via des mesures de ces polluants dans diverses matrices incluant le sérum maternel (n=113), paternel (n=104) et du cordon (n=92). Considérant les deux zones géographiques étudiées et le mode de calcul utilisé (approche *lower bound* ou *upper bound*), les valeurs médianes calculées pour la somme des principaux congénères tri- à hepta-bromés (17, 28, 47, 66, 85, 99, 100, 153, 154, 183 et 184) sont de l'ordre de 8,0 ng/g de lipide dans le sérum maternel et paternel, et 12,0 ng/g de lipide dans le sérum du cordon. S'agissant du BDE 209, les mêmes valeurs médianes pour les mêmes échantillons ont été observées à 1,1 ng/g de lipide pour le sérum maternel et paternel, et 1,8 ng/g de lipide pour le sérum du cordon. Aucune corrélation significative n'est apparue entre ces niveaux d'imprégnation et l'âge, le sexe ou la région d'origine des sujets.

Antignac et coll. (2009) ont de même recherché la présence de PBDE dans le sérum du cordon d'une centaine de nouveau-nés français. Les 7 principaux congénères PBDE tri- à hepta-bromés (28, 47, 99, 100, 153, 154 et 183) ont

été détectés dans certains de ces échantillons (entre 1 et 74 sur 90), la somme de ces composés ayant pu au final être déterminée dans 77 échantillons. Les valeurs moyennes et médianes obtenues sont respectivement de 1,7 et 0,7 ng/g de lipide. Les congénères plus hautement bromés (octa- à déca-bromés) ont également été détectés dans certains de ces échantillons (entre 9 et 63), leur somme ayant été déterminée dans 72 d'entre eux. Les valeurs moyennes et médianes obtenues sont respectivement de 48,9 et 12,3 ng/g de lipide, soulignant la part majeure de ces composés hautement bromés dans l'exposition totale des populations aux PBDE.

L'étude belge de Roosens et coll. (2010) a également rapporté les niveaux de concentration en PBDE dans un ensemble d'échantillons de sang du cordon. Les valeurs observées pour la somme des principaux congénères tri- à hepta-bromés varient de 1,5 à 3,0 ng/g de lipide (médiane : 2,1).

L'équipe de Frederiksen et coll. (2009b) a mesuré les niveaux de concentrations des principaux congénères PBDE dans une cinquantaine d'échantillons de placenta collectés chez des femmes danoises. Les valeurs médianes observées pour la somme de 12 PBDE tri- à hepta-bromés et pour le BDE 209 sont de 1,22 et 1,14 ng/g de lipide, respectivement. La contribution de ce dernier à l'imprégnation globale apparaît donc proche de 50 %, les congénères BDE 47 et BDE 153 étant les seconds contributeurs, à part environ égale. L'étude de Gomara et coll. (2007) a également rapporté, dans des échantillons de placenta collectés chez une population d'une trentaine de femmes espagnoles, des valeurs médianes de 0,6 et 1,0 ng/g de lipide pour la somme des mêmes congénères tri- à hepta-bromés et pour le BDE 209, respectivement.

Tableau 43.I : Synthèse des études sur le sérum du cordon

Étude	Population	Congénères	Médiane [min-max] (ng/g lipides)
Guvenius et coll., 2003	Suédoise (n=15)	10 tri- à hepta-bromés	1,7 [0,5-4,3]
Jaraczewska et coll., 2006	Polonaise (n=22)	6 tri- à hepta-bromés	2,0 [0,8-8,4]
Gomara et coll., 2007	Espagnole (n=44)	11 tri- à hepta-bromés	13 [4,2-73]
		BDE 209	2,2 [<1,1-11]
Antignac et coll., 2009	Française (n=90)	7 tri- à hepta-bromés	0,7 [0,1-17,1]
		9 octa- à déca-bromés	12,3 [0,9-363]
		BDE 209	27,1 [3,5-363]
Frederiksen et coll., 2009b[a]	Danoise (n~50)	12 tri- à hepta-bromés	1,2 [0,4-15,9]
		BDE 209	1,1 [<0,3-5,4]
Roosens et coll., 2010	Flamande (n=8 pools ; n=735 sujets)	7 tri- à hepta-bromés	2,1 [1,5-3,0]

[a] Étude dans le placenta

Exposition du nourrisson

Dans l'étude précédemment citée, Antignac et coll. (2009) ont rapporté, dans le lait collecté auprès d'une centaine de mères françaises, des niveaux de concentration variant de 0,3 à 19,9 ng/g de lipide pour la somme des 7 congénères PBDE majoritaires tri- à hepta-bromés (28, 47, 99, 100, 153, 154 et 183) et de 0,7 à 11,6 ng/g de lipide pour la somme des congénères octa- à déca-bromés (valeurs médianes de 2,5 et 3,4 ng/g de lipide, respectivement) (tableau 43.II). Ces données objectivent la réalité d'une exposition aux PBDE du nourrisson allaité, avec un apport total estimé en PBDE tri- à déca-bromés de l'ordre de 80 ng/j pour une consommation quotidienne de 500 ml de lait. Une corrélation significative a par ailleurs été observée entre les teneurs cumulées mesurées dans le lait maternel et le tissus adipeux des mêmes sujets ($R=0,695$; $p<0,001$), suggérant un équilibre entre les deux compartiments et un effet de réservoir du tissu adipeux vis-à-vis de ces contaminants lipophiles.

L'étude de Gomara et coll. (2007) présente pour une vingtaine d'échantillons de lait maternel collectés chez une population de femmes espagnoles, des valeurs médianes de 2,0 et 2,8 ng/g de lipide pour la somme des congénères tri- à hepta-bromés et pour le BDE 209, respectivement.

Ingelido et coll. (2007) ont rapporté des valeurs médianes de 2,3 et 4,1 ng/g de lipide pour la somme de 11 congénères tri- à hepta-BDE dans une quarantaine d'échantillons de lait maternel collectés chez des femmes italiennes des régions de Venise et Rome, respectivement, démontrant la variabilité importante de ces niveaux d'imprégnation selon l'origine géographique des sujets qui reflète elle-même la disparité des niveaux et voies d'expositions à ces substances. Aucune association significative n'a été observée entre ces niveaux d'imprégnation et la consommation de poisson des sujets considérés.

Kalantzi et coll. (2004) ont également calculé, pour une population d'une cinquantaine de femmes au Royaume-Uni, une valeur médiane de 6,4 ng/g de lipide pour la somme de 15 congénères tri- à hepta-BDE, les congénères BDE 47 et BDE 153 étant, comme cela a été observé par plusieurs autres équipes, les principaux contributeurs à ces niveaux d'imprégnation. L'étude de Thomsen et coll. (2010) présente des concentrations de PBDE dans un ensemble de 393 prélèvements de lait maternel collectés chez des femmes norvégiennes âgées de 16 à 42 ans. Les valeurs médianes observées pour la somme des 7 principaux congénères tri- à hepta-bromés (28, 47, 99, 100, 153, 154 et 183) et pour le BDE 209 sont de 2,1 et de 0,32 ng/g de lipide, respectivement.

Roosens et coll. (2010) ont décrit les niveaux de concentration en PBDE dans un ensemble d'échantillons de lait maternel (22 mélanges de 3 à 16 prélèvements individuels regroupés par localisation géographique et tranche d'âge) collectés auprès de femmes flamandes. La valeur médiane observée pour la somme des 7 principaux congénères tri- à hepta-bromés (28, 47, 99, 100, 153,

154 et 183) est de 3,0 ng/g de lipide, en accord avec les quelques autres études européennes publiées sur le sujet. Le BDE 209 a également été retrouvé dans les mêmes échantillons, à une concentration médiane de 5,9 ng/g de lipide, valeur cette fois plus élevée que celle obtenue par l'étude précédente de Gomara et coll. (2007).

L'étude de Hooper et coll. (2007) a apporté de plus une information concernant la décroissance des niveaux de concentrations en PBDE dans le lait maternel durant la lactation chez une dizaine de femmes primipares aux États-Unis. Les résultats ont montré une décroissance assez faible de ces teneurs, soit d'environ 1 % par mois sur 6 mois. L'exposition du second enfant ne semble donc pas significativement plus faible que celle du premier, comme cela est le cas pour d'autres polluants organiques persistants.

Tableau 43.II : Synthèse des études menées sur le lait maternel

Étude	Population	Congénères	Médiane [min-max] (ng/g lipides)
Guvenius et coll., 2003	Suédoise (n=15)	10 tri- à hepta-bromés	2,14 [0,56-7,72]
Kalantzi et coll., 2004	Britannique (n=54)	15 tri- à hepta-BDE	6,3 [0,3-69]
Gomara et coll., 2007	Espagnole (n=22)	11 tri- à hepta-bromés	2,0 [1,0-21]
		BDE 209	2,9 [<0,16-52]
Ingelido et coll., 2007	Italienne (n~40)	11 tri- à hepta-BDE	[1,6-4,1][a]
Antignac et coll., 2009	Française (n=77)	7 tri- à hepta-bromés	2,5 [0,3-19,9]
		9 octa- à déca-bromés	3,4 0,7-11,6]
		BDE 209	1,6 [0,4-6,8]
Thomsen et coll., 2010	Norvégienne (n=393)	7 tri- à hepta-bromés	2,1 [0,5-82]
		BDE 209	0,3 [<loq-5,8]
Roosens et coll., 2010	Flamande (22 pools)	7 tri- à hepta-bromés	3,0 [2,0-6,4]
	(3 à 16 sujets/pool))	BDE 209	5,9 [2,8-34,7]

[a] Pas de médiane : valeurs extrêmes de 4 sous-groupes étudiés

Évaluations en cours pour les doses journalières tolérables

L'étude de Bakker et coll. (2008) a estimé, pour le BDE 99 chez l'Homme, une limite maximale sans effet (NOAEL) comprise entre 18,8 et 41,4 ng/kg/j s'agissant de la toxicité neurodéveloppementale, et comprise entre 0,23 et 0,30 ng/kg/j s'agissant de l'impact sur la spermatogenèse. Si la valeur médiane d'exposition alimentaire globale estimée par les mêmes auteurs pour ce congénère (0,11 ng/kg/j) apparaît plus de 100 fois inférieure à la première NOAEL citée, la valeur d'exposition haute calculée pour le 99e percentile (0,24 ng/kg/j) reste questionnable par rapport à la seconde NOAEL.

Des valeurs seuils ont été fixées en 2008 par l'US-EPA (US-EPA/IRIS, 2008a, b, c, d). Il s'agit de valeurs toxicologiques de référence ou « *reference dose* » (ou RfD) en anglais.

Ces valeurs sont :
- pour le BDE 47 de 0,1 µg/kg/j (basé sur l'étude d'Eriksson et coll., 2001) ;
- pour le BDE99 de 0,1 µg/kg/j (basé sur l'étude de Viberg et coll., 2004) ;
- pour le BDE 153 de 0,2 µg/kg/j (basé sur l'étude de Viberg et coll., 2003) ;
- pour le BDE 209 de 7 µg/kg/j (basé sur l'étude de Viberg et coll., 2003).

Les évaluations sont en cours pour l'ensemble des PBDE à l'EFSA.

Toxicocinétique et biotransformation

Le comportement du BDE 209 se distingue nettement des autres congénères de PBDE. Il convient de ce fait de le traiter séparément.

BDE 209

Contrairement aux premières données qui indiquaient, pour le BDE 209 administré par voie orale à fortes doses, des niveaux de biodisponibilité quasi nuls chez les rongeurs, des études plus récentes réalisées chez le rat à des doses proches du mg/kg de poids corporel indiquent des niveaux d'absorption digestive compris entre 10 et 26 % de la dose (Mörck et coll., 2003 ; Sandholm et coll., 2003). Une fois absorbé, outre le tractus digestif, le BDE 209 est localisé principalement dans les surrénales et le foie. Dans une étude réalisée chez des femelles en gestation, les ovaires constituent également un tissu cible (Riu et coll., 2008). En dépit de son caractère très lipophile, le BDE 209 n'est que très peu retenu dans le tissu adipeux et franchit difficilement la barrière hémato-méningée. En revanche, le PBDE traverse le placenta et peut donc facilement contaminer le fœtus lors d'une exposition de la mère. Riu et coll. (2008) ont exposé par gavage quotidien des rates en gestation (j16 à j19) à du ^{14}C- BDE 209. Au sacrifice des animaux, 24 h après la dernière administration, la radioactivité présente dans les fœtus représente 0,5 % de la dose administrée.

Mörck et coll. (2003) ont exploré les voies métaboliques du BDE 209 chez des rats traités par voie orale par du BDE 209 radiomarqué. L'analyse des métabolites tissulaires ainsi que des métabolites éliminés dans l'urine, la bile ou les fèces révèle la présence de produits phénoliques conjugués ou libres ainsi que des composés méthoxylés comprenant 5 à 7 atomes de brome. Ces métabolites suggèrent que le BDE 209 subit dans un premier temps une débromation suivie par hydroxylation du noyau aromatique pour former un catéchol, soit par l'intermédiaire d'un arène-oxyde soit par une double hydroxylation. Le catéchol ainsi formé peut ensuite être méthylé, probablement par l'action d'une catéchol-O-méthyltransférase, formant ainsi un gaïacol (figure 43.1).

Les études ultérieures ont confirmé la débromation du BDE 209 ainsi que la formation de métabolites hydroxylés et méthoxylés (Hakk et Lechter, 2003 ; Sandholm et coll., 2003 ; Huwe et Smith, 2007 ; Riu et coll., 2008). Outre le rôle des cytochromes P450 dans la débromation du BDE 209, Huwe et Smith (2007) ont émis l'hypothèse que les déiodinases pourraient également être impliquées dans cette première étape métabolique. Une partie des métabolites hydroxylés peuvent également être pris en charge par les enzymes de phase II et former des conjugués. La structure de ces conjugués n'a cependant pas été clairement identifiée. Au cours du métabolisme, plusieurs auteurs ont mentionné la formation de résidus liés, en particulier dans les tissus tels que l'intestin (Mörck et coll., 2003 ; Riu et coll., 2008), suggérant la formation de métabolites réactifs.

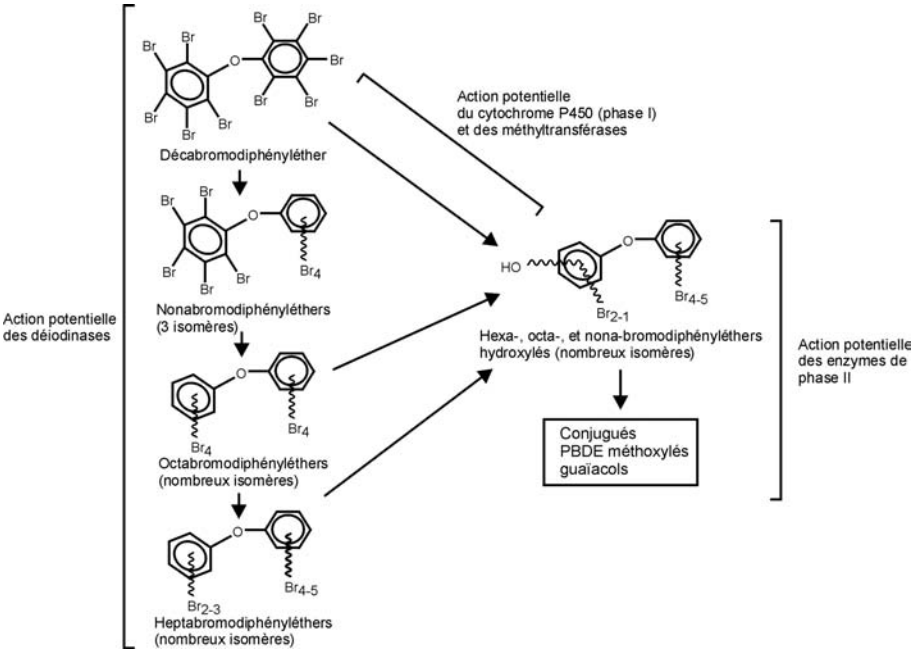


Figure 43.1 : Métabolisme du BDE 209 (d'après Environnement Canada, 2009)

Les études conduites chez le rat indiquent qu'après administration orale, la majeure partie du BDE 209 est éliminée dans les fèces sous 24 h, alors que l'élimination urinaire est négligeable (Mörck et coll., 2003). Mörck et coll. (2003) ont montré que le BDE 209 et ses métabolites pouvaient être éliminés dans la bile, il est probable qu'une partie des résidus fécaux proviennent de l'excrétion biliaire.

Chez le rat, la demi-vie du BDE 209 a été estimée à 2-4 jours (Sandholm et coll., 2003 ; Huwe et coll., 2008a), ce qui est nettement plus faible que la valeur de 15 jours proposée par Thuresson et coll. (2006) pour l'homme.

La revue très complète de Hardy et coll. (2009) dresse un état des lieux concernant les connaissances actuelles relatives à la pharmacocinétique et à la toxicité du BDE 209. Il ressort de l'ensemble des études, relativement anciennes et conduites chez le rongeur, que le BDE 209 est faiblement absorbé au niveau gastro-intestinal, que les niveaux de concentration tissulaires sont également très faibles (moins de 10 % dans le foie et moins de 1 % dans les autres organes), et que l'élimination fécale semble la voie prépondérante, celle-ci intervenant rapidement (moins de 3 jours) après exposition.

Autres congénères

Plusieurs travaux ont été publiés sur la toxicocinétique des congénères moins bromés que le BDE 209. Ils montrent que la biodisponibilité de ces PBDE administrés par voie orale est bien supérieure à celle du BDE 209. Pour le BDE 47, les taux d'absorption digestive chez le rat sont compris entre 75 et 85 % chez les rongeurs (Staskal et coll., 2005 et 2006a ; Sanders, 2006). Elle est du même ordre pour le BDE 154 (Hakk et coll., 2009) alors qu'elle est d'environ 60 % pour le BDE 99 (Hakk et coll., 2002). Après avoir été absorbés, ces PBDE sont principalement retenus dans le tissu adipeux.

Chez la souris adulte exposée à des PBDE radiomarqués (BDE 47, 85 et 99) par voie intraveineuse ou orale, Darnerud et coll. (2006) ont montré par autoradiographie une distribution et une rémanence de ces BDE principalement dans le tissu adipeux et le foie. La présence de ces composés dans le cortex surrénalien, le poumon, l'ovaire, et le cerveau a également été observée, avec toutefois pour ces organes une diminution rapide de la radioactivité détectée après traitement. Le transfert au fœtus lors de la gestation est apparu limité, à l'inverse du transfert à la descendance lors de la période de lactation (environ 20 % de la dose administrée de penta-BDE).

Sanders et coll. (2006) ont examiné l'impact sur la distribution et l'accumulation des résidus d'une administration répétée de BDE 47 à faible dose (0,1 µmol/kg, soit approximativement 0,05 mg/kg). Pendant la durée de l'étude (10 jours), l'accumulation de radioactivité suit une courbe linéaire sans atteindre de plateau dans la plupart des tissus. Le tissu adipeux, et dans une moindre mesure les surrénales, sont les principaux tissus dans lesquels le BDE 47 est retenu. Chen et coll. (2006) et Hakk et coll. (2009) ont montré que le tissu adipeux et les surrénales étaient également les principaux tissus cibles respectivement du BDE 99 du BDE 154 chez les rongeurs.

Huwe et coll. (2008b) ont distribué pendant 21 jours à des rats mâles un aliment dans lequel a été incorporé un mélange reflétant le profil de contamination des poussières en PBDE, et correspondant à une dose de 6 µg/kg/j. Les concentrations tissulaires de 15 PBDE ont été mesurées. Les BDE contenant 3 à 6 atomes de brome représentent plus de 80 % des PBDE totaux dans le tissu adipeux, le cerveau, le rein, le poumon et la carcasse résiduelle, mais moins de 40 % dans le plasma et le foie. Parmi les BDE les plus retenus dans l'organisme

figurent les BDE 28/33 (non séparés dans l'analyse), 47 et 153. Le BDE 209 est celui qui est le moins retenu (non détecté dans le tissu adipeux ou la carcasse).

L'analyse des métabolites urinaires, biliaires, fécaux et tissulaires du BDE 47 montre que ce PBDE peut subir différentes biotransformations (EPA, 2008). L'action des cytochromes P450 conduit à l'oxydation du BDE 47, produisant une série de métabolites hydroxylés. La formation d'un intermédiaire réactif est probablement à l'origine de la production de conjugués au glutathion, identifiés dans la bile de rats exposés au BDE 47, alors que des conjugués sulfates et glucuronides ont été mis en évidence dans l'urine (Sanders et coll., 2006). Des voies métaboliques analogues ont été décrites pour le BDE 99 (Chen et coll., 2006) et le BDE 153 (Staskal et coll., 2006b). Récemment, Lupton et coll. (2009) ont montré que le BDE 47 pouvait être métabolisé par des microsomes hépatiques humains en 2,4-dibromophénol et en BDE 47 dihydroxylé, et Stapleton et coll. (2009) ont obtenu du tribromophénol et deux pentabromodiphényles dihydroxylés en incubant des hépatocytes humains avec du BDE 99.

D'importantes différences dans les voies d'élimination du BDE 47 ont été observées chez les rongeurs. Alors que l'élimination urinaire de ce PBDE peut représenter 10 à 40 % de la dose administrée chez la souris, seules des traces sont observées chez des rats traités dans des conditions analogues (Staskal et coll., 2005 ; Sanders et coll., 2006).

Les voies métaboliques du BDE 47 sont schématisées dans la figure 43.2.

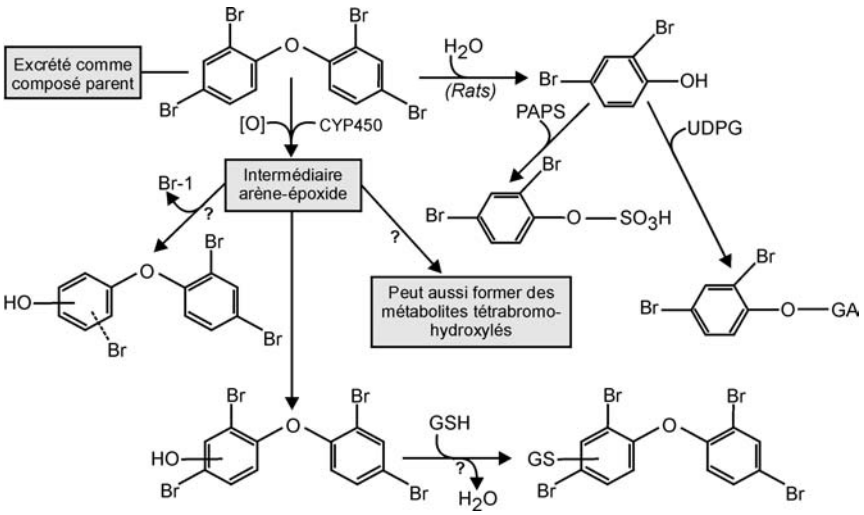


Figure 43.2 : Voies métaboliques du BDE 47 (d'après EPA, 2008)

Un modèle PBPK (*physiologically based pharmacokinetic*) basé sur 8 compartiments a été développé par Emond et coll. (2010) à partir de données établies

pour le BDE 47 chez la rate adulte. Ce modèle est capable de prédire, à partir de données obtenues chez la rate non gravide, les concentrations dans différents tissus ou compartiments (incluant le fœtus) de rates en gestation exposées de façon ponctuelle ou chronique au BDE 47.

Tétrabromobisphénol A (TBBPA)

Les études expérimentales sur le devenir du TBBPA sont peu nombreuses. En mesurant le niveau d'excrétion biliaire chez des rats ayant reçu par gavage une dose unique de ^{14}C-TBBPA (2 mg/kg), Hakk et coll. (2000) ont montré que plus de 70 % de la dose était éliminée par cette voie en 72 h. Ces travaux indiquent que l'absorption est importante (>70 % de la dose) et que la voie d'élimination est principalement la voie biliaire. Dans cette même étude, les quantités éliminées dans l'urine chez des rats dont le canal cholédoque n'avait pas été canulé représentaient moins de 0,5 % de la dose administrée. Les mesures de résidus réalisées en fin d'expérimentation sur des animaux non canulés, c'est-à-dire 72 h après le traitement, ont montré qu'il n'y avait aucune rétention tissulaire (résidus totaux <2 % de la dose), l'essentiel de la radioactivité restante étant localisée dans l'intestin.

Plus récemment, Riu (2006) a étudié le devenir du TBBPA chez la rate en gestation traitée quotidiennement par gavage pendant 4 jours avec du ^{14}C-TBBPA (190 µg/kg/j). Les animaux ont été euthanasiés 24 h après la dernière administration. Les résultats obtenus confirment ceux de Hakk et coll. (2000) avec une radioactivité mesurée dans les tissus et dans le reste de la carcasse inférieure à 0,5 % de la dose. Les niveaux résiduels les plus élevés ont été détectés dans la paroi intestinale et dans le foie. Moins de 0,01 % de la radioactivité totale a été retrouvée dans les fœtus, indiquant un passage transplacentaire très limité et une exposition fœtale mineure. L'analyse en radio-HPLC des extraits fécaux indique que la totalité de la radioactivité est sous forme de TBBPA inchangé, alors que les extraits de paroi intestinale indiquent que la majeure partie de la radioactivité est sous forme de conjugués sulfates ou glucuronides, sans que ces métabolites aient pu être identifiés de façon plus précise.

L'analyse des métabolites biliaires réalisée par Hakk et coll. (2000) indique la présence de conjugués mono- et di-glucuronides du TBBPA ainsi que d'un conjugué mixte glucuronide-sulfate. La présence de tribromoBPA dans les fèces (Szymanska et coll., 2001) et le plasma (Schauer et coll., 2006) de rats traités au TBBPA a été détectée, suggérant une déchloration de ce composé. Des travaux récents réalisés à partir de fractions cellulaires hépatiques humaines et murines montrent qu'en présence de NADPH, il y a non seulement formation d'un glucuronide mais également de deux métabolites hydroxylés dont la structure reste à déterminer (Zalko et coll., 2010).

Hexabromocyclododécane (HBCD)

Les données anciennes publiées sur la toxicocinétique de l'HBCD se résument pour l'essentiel à la courte revue des résultats obtenus par les firmes productrices réalisée par Hakk et Letcher (2003). Il y apparaît que le HBCD est rapidement et largement absorbé après administration d'une dose unique par voie orale. Les résidus sont retenus avant tout dans le tissu adipeux et l'administration réitérée de TBBPA conduit à une accumulation dans ce tissu. Soixante douze heures après une dose unique, l'élimination est principalement fécale (environ 70 % de la dose) et dans une moindre mesure urinaire (16 % de la dose). Dans une étude récente chez des souris traitées oralement avec du ^{14}C- gamma-HBCD (3 mg/kg), Szabo et coll. (2010) ont estimé l'absorption orale à environ 85 % et observé des niveaux de résidus tissulaires plus importants dans le foie que dans les autres tissus (tissu adipeux, sang et cerveau). Des métabolites de l'HBCD ont été mis en évidence à partir d'échantillons de tissus (gras, foie, muscle, poumon) prélevés sur des rats ayant reçu dans leur alimentation durant 28 jours des doses de HBCD correspondant à 30 et 100 mg/kg/j (Brandsma et coll., 2009). Il s'agit de pentabromocyclododécène, de tétrabromocyclododécène, de métabolites mono- et di-hydroxylés de HBCD, et de dihydroxy-pentabromocyclododécène. Ces structures indiquent que la débromation et l'hydroxylation sont les deux principales voies métaboliques de l'HBCD.

En conclusion, la génération de données précises et fiables d'exposition et d'imprégnation concernant les retardateurs de flamme bromés représente un challenge sur le plan analytique encore plus important que pour d'autres composés. Une première raison est le niveau de technicité requis tant pour la préparation des échantillons biologiques (procédures d'extraction et de purification lourdes) que pour la mesure de ces molécules (la méthode de choix reste le couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse haute résolution). Une seconde raison est la difficulté de gestion des contaminations environnementales pour ces contaminants ubiquistes (variabilité des niveaux de ces contaminations et des règles de détermination des limites de quantification). Ces éléments pourraient notamment être à l'origine de disparités s'agissant de la distribution des niveaux de concentration mesurés sur un même jeu d'échantillons mais sur la base de méthodologies différentes. Sans remettre en cause de façon globale ni les différentes études disponibles, ni même l'ordre de grandeur des niveaux d'imprégnation aux RFB rapportés, ces éléments sont néanmoins à prendre en compte dans l'optique d'une évaluation du risque précise liée à ces composés.

Les différentes études disponibles n'ont pas toutes recherché les mêmes congénères PBDE, ce qui rend délicate la comparaison des valeurs médianes d'exposition et d'imprégnation rapportées.

De façon très générale, les valeurs d'exposition aux PBDE estimées sont de l'ordre de 50 à 150 ng/j. Pour l'adulte en population générale, ces valeurs

apparaissent assez largement en deçà des valeurs NOAEL estimées par rapport à des effets neurodéveloppementaux ou sur la spermatogenèse, mais restent proches pour des sous-populations particulièrement exposées (par exemple les forts consommateurs de poissons) et/ou à risque (fœtus, nourrisson…).

La présence de plusieurs représentants de cette classe de polluants chimiques dans certains fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum ou le lait maternel, les teneurs observées sont de façon générale de l'ordre de quelques ng/g de lipide.

Une tendance à une diminution des niveaux d'imprégnation a été rapportée pour les principaux congénères de type PBDE depuis le début des années 2000, correspondant à un arrêt de la production et de l'utilisation des deux mélanges industriels penta- et octa-BDE. En revanche, cette observation ne concerne pas les autres représentants de cette famille de composés toujours utilisés, en particulier le BDE 209, l'HBCD ou encore le TBBPA. Mais il est à noter que les données disponibles concernant ces dernières substances sont extrêmement limitées voire inexistantes sur ce plan.

Une différence de profil de contamination en PBDE entre le sang maternel et le sang du cordon est rapportée par plusieurs études, la proportion de BDE 209 apparaissant notamment plus élevée dans ce dernier. La présence des congénères les plus fortement bromés (octa- à déca-bromés) à un niveau égal ou supérieur à celui des congénères plus faiblement bromés (tri- à hepta-bromés) a également été rapportée dans le lait maternel. Ces deux observations suggèrent une exposition particulièrement critique du fœtus et du nouveau-né allaité à ces polluants au fort degré de bromation.

Bibliographie

ANTIGNAC JP, CARIOU R, ZALKO D, BERREBI A, CRAVEDI JP, et coll. Exposure assessment of French women and their newborn to brominated flame retardants : determination of tri- to deca- polybromodiphenylethers (PBDE) in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Environ Pollut* 2009, **157** : 164-173

BAKKER MI, DE WINTER-SORKINA R, DE MA, BOON PE, VAN DG, et coll. Dietary intake and risk evaluation of polybrominated diphenyl ethers in The Netherlands. *Mol Nutr Food Res* 2008, **52** : 204-216

BOCIO A, LLOBET JM, DOMINGO JL, CORBELLA J, TEIXIDÓ A, CASAS C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs : human exposure through the diet. *J Agric Food Chem* 2003, **51** : 3191-3195

BRADMAN A, FENSTER L, SJODIN A, JONES RS, PATTERSON DG JR., ESKENAZI B. Polybrominated diphenyl ether levels in the blood of pregnant women living in an agricultural community in California. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 71-74

BRANDSMA SH, VAN DER VEN LT, DE BOER J, LEONARDS PE. Identification of hydroxylated metabolites of hexabromocyclododecane in wildlife and 28-days exposed Wistar rats. *Environ Sci Technol* 2009, **43** : 6058-6063

CHEN LJ, LEBETKIN EH, SANDERS JM, BURKA LT. Metabolism and disposition of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE99) following a single or repeated administration to rats or mice. *Xenobiotica* 2006, **36** : 515-534

CHEN SJ, MA YJ, WANG J, CHEN D, LUO XJ, MAI BX. Brominated flame retardants in children's toys : concentration, composition, and children's exposure and risk assessment. *Environ Sci Technol* 2009, **43** : 4200-4206

DARNERUD PO, RISBERG S. Tissue localisation of tetra- and pentabromodiphenyl ether congeners (BDE-47, -85 and -99) in perinatal and adult C57BL mice. *Chemosphere* 2006, **62** : 485-493

EMOND C, RAYMER JH, STUDABAKER WB, GARNER CE, BIRNBAUM LS. A physiologically based pharmacokinetic model for developmental exposure to BDE-47 in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, **242** : 290-298

ENVIRONMENT CANADA (EC). State of the science report on the bioaccumulation and transformation of Decabromodiphenyl Ether. *Canadian Environmental Protection Act Review,* 2009 (http://www.ec.gc.ca/ceparegistry/subs_list/decaBDE)

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Toxicological review of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) (cas no. 5436-43-1), Washington, 2008 : 85pp (http ://www.epa.gov/IRIS/toxreviews/1010tr.pdf)

FANGSTROM B, HOVANDER L, BIGNERT A, ATHANASSIADIS I, LINDERHOLM L, et coll. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, polychlonnated biphenyls, and polychlorobiphenylols in serum from pregnant Faroese women and their children 7 years later. *Environ Sci Technol* 2005, **39** : 9457-9463

FANGSTROM B, ATHANASSIADIS I, ODSJO T, NOREN K, BERGMAN A. Temporal trends of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in milk from Stockholm mothers, 1980-2004. *Mol Nutr Food Res* 2008, **52** : 187-193

FOOD STANDARDS AGENCY. Brominated chemicals : UK dietary intakes. Food survey information sheet(10/06), 2006 (http ://www.food.gov.uk/science/fsisbranch2006/fsis1006)

FRASER AJ, WEBSTER TF, MCCLEAN MD. Diet contributes significantly to the body burden of PBDEs in the general U.S. population. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1520-1525

FREDERIKSEN M, VORKAMP K, THOMSEN M, KNUDSEN LE. Human internal and external exposure to PBDEs-a review of levels and sources. *Int J Hyg Environ Health* 2009a, **212** : 109-134

FREDERIKSEN M, THOMSEN M, VORKAMP K, KNUDSEN LE. Patterns and concentration levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placental tissue of women in Denmark. *Chemosphere* 2009b, **76** : 1464-1469

GOMARA B, HERRERO L, RAMOS JJ, MATEO JR, FERNANDEZ MA, et coll. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, paternal serum, maternal serum, placentas, and breast milk from Madrid population, Spain. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 6961-6968

GUVENIUS DM, ARONSSON A, EKMAN-ORDEBERG G, BERGMAN A, NOREN K. Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated

biphenyls, polychlorobiphenylols, and pentachlorophenol. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1235-1241

HAKK H, HUWE JK, LARSEN GL. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 2009, **39** : 46-56

HAKK H, LETCHER RJ. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants-a review. *Environ Int* 2003, **29** : 801-828

HAKK H, LARSEN G, BERGMAN A, ORN U. Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica* 2000, **30** : 881-890

HAKK H, LARSEN G, KLASSON-WEHLER E. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotic* 2002, **32** : 369-382

HAMERS T, KAMSTRA JH, SONNEVELD E, MURK AJ, VISSER TJ, et coll. Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47). *Mol Nutr Food Res* 2008, **52** : 284-298

HARDY ML, BANASIK M, STEDEFORD T. Toxicology and human health assessment of decabromodiphenylether. *Crit Rev Toxicol* 2009, **39** : 1-44

HARRAD S, WIJESEKERA R, HUNTER S, HALLIWELL C, BAKER R. Preliminary assessment of U.K. human dietary and inhalation exposure to polybrominated diphenyl ethers. *Environ Sci Technol* 2004, **38** : 2345-2350

HERBSTMAN JB, SJODIN A, APELBERG BJ, WITTER FR, PATTERSON DG, et coll. Determinants of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in an urban population. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1794-1800

HOOPER K, SHE J, SHARP M, CHOW J, JEWELL N, GEPHART R, HOLDEN A. Depuration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk from California first-time mothers (primiparae). *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1271-1275

HUWE JK, HAKK H, BIRNBAUM LS. Tissue distribution of polybrominated diphenyl ethers in male rats and implications for biomonitoring. *Environ Sci Technol* 2008a, **42** : 7018-7024

HUWE JK, HAKK H, SMITH DJ, DILIBERTO JJ, RICHARDSON V, et coll. Comparative absorption and bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers following ingestion via dust and oil in male rats. *Environ Sci Technol* 2008b, **42** : 2694-2700

HUWE JK, SMITH DJ. Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male sprague-dawley rats following dietary exposure. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 2371-2377. Erratum in : *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 4486

IMM P, KNOBELOCH L, BUELOW C, ANDERSON HA. Household exposures to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a Wisconsin Cohort. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1890-1895

INGELIDO AM, BALLARD T, DELLATTE E, DI DOMENICO A, FERRI F, et coll. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in milk from Italian women living in Rome and Venice. *Chemosphere* 2007, **67** : S301-306

JARACZEWSKA K, LULEK J, COVACI A, VOORSPOELS S, KALUBA-SKOTARCZAK A, et coll. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Sci Total Environ* 2006, **372** : 20-31

KALANTZI OI, MARTIN FL, THOMAS GO, ALCOCK RE, TANG HR, et coll. Different levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and chlorinated compounds in breast milk from two U.K. Regions. *Environ Health Perspect* 2004, **112** : 1085-1091

KIVIRANTA H, OVASKAINEN ML, VARTIAINEN T. Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environ Int* 2004, **30** : 923-932

LIND Y, AUNE M, ATUMA S, BECKER W, BJERSELIUS R, et coll. Food intake of the brominated flame retardants, PBDEs and HCBD in Sweden Organohalogens. *Compd* 2002, **58** : 181-184

LUPTON SJ, MCGARRIGLE BP, OLSON JR, WOOD TD, AGA DS. Human liver µsome-mediated metabolism of brominated diphenyl ethers 47, 99, and 153 and identification of their major metabolites. *Chem Res Toxicol* 2009, **22** : 1802-1809

MORCK A, HAKK H, ORN U, KLASSON WEHLER E. Decabromodiphenyl ether in the rat : absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metab Dispos* 2003, **31** : 900-907

RIU A. Devenir des retardateurs de flammes bromés chez le rat et l'homme : caractérisation des métabolites et évaluation de l'exposition fœtale. *Thèse INP Toulouse*. 2006. http ://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000479/01/riu.pdf

RIU A, CRAVEDI JP, DEBRAUWER L, GARCIA A, CANLET C, et coll. Disposition and metabolic profiling of [14C]-decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats. *Environ Int* 2008, **34** : 318-329

ROOSENS L, D'HOLLANDER W, BERVOETS L, REYNDERS H, VAN CAMPENHOUT K, et coll. Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environ Pollut* 2010, **158** : 2546-2452

RYAN JJ, PATRY B. Body burdens and food exposure in Canada for polybrominated diphenyl ethers (BDEs). *Organohalogens Compd* 2001, **51** : 226-229

SANDERS JM, CHEN LJ, LEBETKIN EH, BURKA LT. Metabolism and disposition of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether following administration of single or multiple doses to rats and mice. *Xenobiotica* 2006, **36** : 103-117

SANDHOLM A, EMANUELSSON BM, WEHLER EK. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica* 2003, **33** : 1149-1158

SCHAUER UM, VÖLKEL W, DEKANT W. Toxicokinetics of tetrabromobisphenol a in humans and rats after oral administration. *Toxicol Sci* 2006, **91** : 49-58

STAPLETON HM, KELLY SM, PEI R, LETCHER RJ, GUNSCH C. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 197-202

STASKAL DF, DILIBERTO JJ, DEVITO MJ, BIRNBAUM LS. Toxicokinetics of BDE 47 in female mice : effect of dose, route of exposure, and time. *Toxicol Sci* 2005, **83** : 215-223

STASKAL DF, DILIBERTO JJ, BIRNBAUM LS. Disposition of BDE 47 in developing mice. *Toxicol Sci* 2006a, **90** : 309-316

STASKAL DF, HAKK H, BAUER D, DILIBERTO JJ, BIRNBAUM LS. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in mice. *Toxicol Sci* 2006b, **94** : 28-37

SZABO DT, DILIBERTO JJ, HAKK H, HUWE JK, BIRNBAUM LS. Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane gamma : effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. *Toxicol Sci* 2010, **117** : 282-293

SZYMANSKA JA, SAPOTA A, FRYDRYCH B. The disposition and metabolism of tetrabromobisphenol-A after a single i.p. dose in the rat. *Chemosphere* 2001, **45** : 693-700

THOMSEN C, STIGUM H, FRØSHAUG M, BROADWELL SL, BECHER G, EGGESBØ M. Determinants of brominated flame retardants in breast milk from a large scale Norwegian study. *Environ Int* 2010, **36** : 68-74

THURESSON K, HOGLUND P, HAGMAR L, SJODIN A, BERGMAN A, JAKOBSSON K. Apparent half-lives of hepta- to decabrominated diphenyl ethers in human serum as determined in occupationally exposed workers. *Environ Health Perspect* 2006, **114** : 176-181

US-EPA/IRIS. Toxicological review of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) (CAS No. 5436-43-1). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/005F. June 2008, U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Washington, DC. 2008a

US-EPA/IRIS. Toxicological review of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) (CAS No. 60348-60-9). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/006F. June 2008. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Washington, DC. 2008b

US-EPA/IRIS. Toxicological review of 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-153) (CAS No.68631-49-2). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/007F. June 2008. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Washington, DC. 2008c

US-EPA/IRIS. Toxicological review of decabromodiphenyl ether (BDE-209) (CAS No. 1163-19-5). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/008F. June 2008. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Washington, DC. 2008d

ZALKO D, PROUILLAC C, PERDU-DURAND E, DOLO L, JOUANIN I, DEBRAUWER L, CRAVEDI JP. 2010 (http ://www.bfr2010.com/abst/2004/Individual%20Papers/BFR2004%20Abstract%20086%20Zalko.pdf)

44
Études épidémiologiques

Il existe peu d'études épidémiologiques ayant analysé les conséquences d'une exposition aux composés polybromés sur les paramètres de la fonction de reproduction chez l'homme ou la femme. Quelques études chez l'homme ont recherché un lien entre la détection de plusieurs BDE dans le lait ou le sang maternel, et des anomalies morphologiques ou hormonales des descendants mâles exposés. Les deux études publiées chez la femme ont analysé le lien potentiel entre la présence de BDE et des anomalies du cycle menstruel ou la fécondabilité.

Effets sur les fonctions de reproduction chez l'homme

Cancer du testicule

Hardell et coll. (2006) ont comparé les niveaux sanguins de PBDE (somme des 3 congénères 47, 99, 153) d'un groupe d'hommes atteints de cancer des testicules recrutés à l'hôpital entre 1997 et 2000 à un groupe d'hommes témoins de même âge (n=58 pour chaque groupe). Aucune différence de niveaux de PBDE n'a été observée pour ces deux groupes. Les mères de ces hommes étaient également contactées pour répondre à un questionnaire et réaliser un prélèvement sanguin pour l'étude. Les mères des cas (n=44) et des témoins (n=45) étaient appariées sur l'âge. Les résultats montrent que les mères ayant les niveaux sanguins de PBDE les plus élevés sont plus souvent des mères de cas que de témoins. Les auteurs concluent que cette étude pourrait indiquer que l'exposition *in utero* (reflétée par les niveaux maternels) est plus importante que les autres fenêtres d'exposition au cours de la vie (reflétée par les niveaux chez les cas et les témoins). Cependant, même s'il s'agit de polluants persistants, il n'est pas évident que les niveaux observés chez ces mères reflètent l'exposition passée aux PBDE trente années auparavant (qui est l'âge médian des hommes inclus). L'étude montre, de plus, un lien entre risque de cancer de testicule et les niveaux sanguins d'autres polluants organiques persistants (POP tels que PCB, HCB). Les auteurs suggèrent ainsi que la plus faible croissance de l'incidence du cancer de testicule observée récemment pourrait s'expliquer par la réduction depuis les années 1980 des expositions (charges corporelles) aux autres POP que les PBDE.

Anomalies de l'appareil génital chez le jeune garçon

À partir de cohortes finlandaise et danoise, l'étude de Main et coll. (2007) a étudié le lien potentiel entre les niveaux de PBDE dans le placenta et le lait de mères ayant donné naissance à des fils présentant ou non une cryptorchidie (n=95 *versus* 185 échantillons de placenta et n=62 *versus* 68 échantillons de lait maternel). Les enfants étaient examinés à la naissance et à l'âge de 3 mois par des personnels formés et de façon standardisée. Les résultats de dosages chimiques des prélèvements biologiques étaient inconnus lors des examens cliniques. Parmi les 14 congénères PBDE recherchés (47, 153, 99, 100, 28, 66, 154, 183, 85, 71, 75, 77, 119, 138), les cinq premiers ont été détectés dans la majorité des placentas. Aucune différence des teneurs de ces congénères ou de leur somme n'a été observée entre les groupes de petits garçons atteints ou non de cryptorchidie. Dans le lait maternel (collecté entre 1 et 3 mois après la naissance), 7 congénères (47, 153, 99, 100, 28, 66, 154) ont été détectés dans tous les échantillons. La somme de ces congénères, ainsi que les concentrations individuelles (sauf pour les BDE 99 et 153) sont apparues de façon statistiquement significative plus élevées dans le groupe des nouveau-nés présentant une cryptorchidie que le groupe des témoins (valeurs médianes pour la somme des 7 PBDE : 4,16 *versus* 3,16 ng/g de lipide, $p<0,007$). Les auteurs précisent qu'en théorie il était attendu que le placenta offre de meilleurs marqueurs pour mesurer l'exposition fœtale que le lait maternel. Or, il est encore mal établi dans la littérature si les PBDE s'accumulent dans le placenta. L'étude de Main et coll. (2007) a montré cependant des fréquences de détection et des niveaux plus faibles de PBDE dans le placenta comparé au lait maternel pour un même groupe d'enfants. Enfin, parce que le lait maternel reflète la charge corporelle de la mère accumulée en PBDE et ainsi son exposition à long terme, il est raisonnable de considérer les concentrations mesurées dans le lait maternel comme marqueurs de l'exposition en début de grossesse et en particulier sur la fenêtre de développement du tractus génital mâle. Cette étude propose une méthodologie robuste et des résultats détaillés. Elle est en revanche basée sur de petits effectifs, il est donc nécessaire de proposer d'autres études pour confirmer ou infirmer ces résultats. Cette étude montre que pour les enfants finlandais, bien que les concentrations de PBDE soient plus élevées pour les enfants cryptorchides que les enfants témoins, la différence des niveaux n'est pas statistiquement significative. Il n'est donc pas à exclure que des cofacteurs non pris en compte dans ces analyses aient une influence sur ces résultats. Des expositions à d'autres contaminants, persistants ou non, pouvant jouer un rôle sur le développement périnatal testiculaire, sont envisageables. Les profils d'exposition aux PBDE étant différents pour les enfants danois et finlandais, il pourrait en être de même pour d'autres co-expositions.

L'étude de Carmichael et coll. (2010) a examiné les niveaux sanguins de PBDE et autres polluants organiques persistants parmi des échantillons collectés en routine en milieu de grossesse de femmes californiennes. Vingt

échantillons ont été choisis parmi des femmes ayant eu un enfant atteint d'hypospadias et 28 échantillons ont été tirés aléatoirement parmi les naissances vivantes de la même année sans malformations répertoriées. L'étude n'a rapporté aucune différence significative dans les niveaux de PBDE et autres polluants entre les deux groupes (tableau 44.I).

Tableau 44.I : Études épidémiologiques sur les anomalies et cancer du testicule chez l'homme

Étude	Population	Exposition/Estimation	Résultats et remarques
Main et coll., 2007	Cohortes finlandaise et danoise	PBDE dans le placenta et le lait maternel BDE 47, 153, 99, 100, 28 détecté dans le placenta BDE 47, 153, 99, 100, 28, 66, 154 dans le lait	Cryptorchidie Placenta : 95 cas *vs* 185 : pas de différences PDBE Lait : 62 cas *vs* 68 : médianes Σ 7 PBDE : concentrations plus élevées dans le groupe des nouveau-nés présentant une cryptorchidie : 4,16 *vs* 3,16 ng/g de lipide, p <0,007
Carmichael et coll., 2010	Femmes californiennes enceintes	PBDE sanguin	Hypospadias : 20 cas *vs* 28 témoins Pas de différences dans concentrations
Hardell et coll., 2006	Étude cas (58) témoins (58)	Taux sanguins de PBDE (Σ BDE 47, 99, 153) Mères (44 cas *vs* 45 témoins)	Cancer du testicule Aucune différence de niveaux de PBDE Les mères ayant les niveaux sanguins de PBDE les plus élevés sont plus souvent des mères de cas que de témoins

Hormones impliquées dans la reproduction

L'étude de Main et coll. (2007), présentée plus haut, a en parallèle réalisé des dosages hormonaux (hormone lutéinisante, LH ; hormone folliculostimulante, FSH ; hormone de liaison aux hormones sexuelles, *Sex Hormone-binding globulin* SHBG ; inhibine B ; testostérone) à partir de prélèvements de sang recueillis à l'examen aux 3 mois des petits garçons. Aucune corrélation n'a été observée entre ces dosages hormonaux et les concentrations de PBDE dans les placentas. Une corrélation positive est observée entre le l'augmentation du taux sérique de LH et la somme des 7 congénères détectés dans le lait maternel ainsi que les concentrations de BDE 47, 100 et 154.

L'étude réalisée dans le Massachusetts par Meeker et coll. (2009) a inclus des hommes âgés de 18 à 55 ans, sans vasectomie, consultant pour infertilité à l'hôpital. Cette étude est caractérisée par un taux de participation estimé à 65 % des sujets éligibles. Parmi 24 de ces hommes recrutés sur la période 2002-2003, le sac aspirateur du domicile a été collecté et ses poussières

analysées pour les trois congénères BDE 47, 99 et 100. Un prélèvement sanguin de ces 24 hommes était collecté pour l'analyse d'hormones, incluant la FSH, la LH, l'inhibine B, la testostérone, la SHBG et l'œstradiol. Les 3 congénères étaient retrouvés dans tous les prélèvements de poussières, et très corrélés entre eux. Les concentrations des trois PBDE étaient associées à une diminution du taux de FSH, de LH et de FAI (*Free androgen index* : ratio de testostérone totale sur SHBG) et à une augmentation du taux d'inhibine B et de SHBG (tableau 44.II).

Tableau 44.II : Études épidémiologiques sur les taux d'hormones chez l'homme

Étude	Population	Exposition/Estimation	Résultats et remarques
Main et coll., 2007	Cohortes finlandaise et danoise	PBDE dans le placenta et le lait maternel BDE 47, 153, 99, 100, 28 détectés dans le placenta BDE 47, 153, 99, 100, 28, 66, 154 dans le lait	↑ LH corrélée avec Σ des 7 congénères détectés dans le lait et concentrations de BDE 47, 100 et 154
Meeker et coll., 2009	24 hommes (18-55 ans), consultant pour infertilité à l'hôpital	Sac aspirateur du domicile (poussières analysées pour BDE 47, 99 et 100)	↓ FSH, LH, FAI[a] ↑ inhibine B, SHBG

[a] FAI : *Free androgen index*, ratio de testostérone totale sur SHBG

Les résultats opposés du lien possible entre concentrations en PBDE et taux de LH entre ces deux études peuvent s'expliquer par l'âge différent des sujets suggérant un rôle possible des PBDE sur les hormones variant avec l'âge, mais également par l'utilisation de matrices différentes, par des concentrations de PBDE différentes...

Effets sur les fonctions de reproduction chez la femme

Seules deux études ont examiné le rôle possible des retardateurs de flamme bromés sur la santé reproductive de la femme (tableau 44.III).

À partir de 20 prélèvements de lait maternel de femmes taïwanaises recrutées en 2001, l'étude de Chao et coll. (2007) a observé des niveaux de PBDE (somme des congénères 17, 28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183, 209) plus élevés pour les femmes ayant des cycles menstruels de durées moyenne et maximale plus courts et pour les femmes ayant des saignements menstruels de durée plus courte. Ces résultats s'appuient sur des petits effectifs et disparaissent après ajustement sur des facteurs confondants (âge, indice de masse corporelle, parité).

Tableau 44.III : Études épidémiologiques chez la femme

Étude	Population	Exposition/Estimation	Résultats et remarques
Chao et coll., 2007	20 prélèvements de lait maternel de femmes taïwanaises	BDE (17, 28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183, 209) du lait	Anomalies des cycles menstruels (petits effectifs, facteurs confondants)
Harley et coll., 2010	Cohorte Chamacos (sous-groupe de 223 femmes)	BDE (47, 99, 100, 153, 17, 28, 66, 85, 154, 183)	Fécondabilité BDE Σ47, 99, 100, 153 et BDE 100 et 153 : ↑ délai nécessaire pour concevoir

À partir d'une cohorte mères-enfants conduite en Californie sur la population immigrante mexicaine (Chamacos), l'étude de Harley et coll. (2010) a étudié le lien potentiel entre les niveaux sériques de PBDE et la fécondabilité pour un sous-groupe de 223 femmes (qui ne diffèrent pas des 601 femmes incluses dans la cohorte entière pour les principaux critères sociodémographiques). Des interviews étaient réalisées au moment de l'inclusion vers la fin du 1er trimestre de grossesse pour renseigner notamment le délai nécessaire à concevoir en mois par une question spécifique et l'aide d'un calendrier. Un prélèvement sanguin était collecté vers la fin du 2e trimestre de grossesse. Dix congénères PBDE étaient dosés (47, 99, 100, 153, 17, 28, 66, 85, 154, 183). Parmi eux, les quatre premiers étaient détectés pour au moins 97 % des échantillons. Les résultats ont montré que plus les niveaux d'imprégnation aux PBDE (pour la somme des 4 congénères prépondérants, et pour les BDE 100 et 153) étaient élevés, plus le délai nécessaire pour concevoir augmentait. Les auteurs ont proposé des analyses de sensibilité sur différents sous-groupes, et notamment les couples qui essayaient activement de concevoir, qui renforçaient les résultats. En revanche, aucune association significative entre les niveaux de PBDE et les longueurs des cycles menstruels déclarées par ces femmes n'a été observée. Cette étude est la première à montrer un impact possible d'une exposition aux PBDE sur le délai nécessaire pour concevoir. S'appuyant sur les expérimentations animales, les auteurs proposent deux hypothèses mécanistiques qu'il est nécessaire d'approfondir pour expliquer ces résultats : l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde ou l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade. Cette étude a mesuré le délai nécessaire pour concevoir une grossesse de façon rétrospective, ce qui peut engendrer des problèmes éventuels de mémoire et biais de déclaration. Enfin, l'étude étant restreinte aux femmes enceintes (« les plus fécondables »), elle sous-estime probablement l'association étudiée.

En conclusion, les études épidémiologiques sont encore trop peu nombreuses pour conclure à un rôle possible des PBDE sur la santé reproductive de l'homme et de la femme. Alors que certaines études reposent sur des échantillonnages cliniques et peu détaillés et ayant des effectifs souvent faibles,

d'autres études d'effectif plus élevé suggèrent des résultats préoccupants (augmentation du délai pour concevoir, perturbation des taux d'hormones LH, cryptorchidie...) qui doivent être confirmés ou infirmés par de nouvelles études. Les mécanismes sous-jacents doivent de plus être élucidés.

Dans les études disponibles, il est difficile de distinguer le rôle des PBDE des autres polluants organiques persistants, tels que les PCB, ayant des structures et des mécanismes d'action similaires aux PBDE, ainsi que des sources potentielles d'exposition communes. Une limite importante de ces études est ainsi l'absence de la prise en compte de ces co-expositions, bien qu'il soit difficile d'isoler le rôle de chaque polluant corrélé. La liste des composés bromés analysés dans les études est constituée des PBDE uniquement. Dans les études référencées, les 4 congénères BDE 47, 153, 99, 100 sont le plus souvent retrouvés. La liste doit être élargie à d'autres retardateurs de flamme bromés (TBBPA).

Bibliographie

CARMICHAEL SL, HERRING AH, SJÖDIN A, JONES R, NEEDHAM L, et coll. Hypospadias and halogenated organic pollutant levels in maternal mid-pregnancy serum samples. *Chemosphere* 2010, **80** : 641-646

CHAO HR, WANG SL, LEE WJ, WANG YF, PAPKE O. Levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from central Taiwan and their relation to infant birth outcome and maternal menstruation effects. *Environ Int* 2007, **33** : 239-245

HARDELL L, BAVEL B, LINDSTRÖM G, ERIKSSON M, CARLBERG M. In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int J Androl* 2006, **29** : 228-234

HARLEY KG, MARKS AR, CHEVRIER J, BRADMAN A, SJODIN A, ESKENAZI B. PBDE concentrations in women's serum and fecundability. *Environ Health Perspec* 2010, **118** : 699-704

MAIN KM, KIVIRANTA H, VIRTANEN HE, SUNDQVIST E, TUOMISTO JT, et coll. Flame retardants in placenta and breast milk and cryptorchidism in newborn boys. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1519-1526

MEEKER JD, JOHNSON PI, CAMANN D, HAUSER R. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in house dust are related to hormone levels in men. *Sci Total Environ* 2009, **407** : 3425-3429

45
Études chez l'animal

Les études publiées chez les mammifères, essentiellement chez le rat ou la souris, se sont le plus souvent focalisées sur la neurotoxicité et les effets sur la glande thyroïde. Certaines de ces études incluent toutefois des critères d'évaluation de reprotoxicité.

Études chez l'animal mâle

On ne dispose que d'un nombre réduit d'études s'intéressant aux possibles effets néfastes des PBDE sur l'appareil urogénital et la reproduction chez le rongeur mâle (tableau 45.I).

Tableau 45.I : Paramètres phénotypiques altérés

Paramètres phénotypiques	Espèce/Lignée	Composé Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids testicules, prostate, vésicules séminales	Rat Wistar Rats mâles et femelles	HBCD ; gavage : 1 et 3 avant accouplement/ gestation /fin de la lactation DE-71 ; gavage : 30 et 60 Période pubertaire	Stoker et coll., 2004 Van der Ven et coll., 2009
Modification des paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité %	Rat Wistar	BDE 99 ; gavage : 0,06 ou 0,3 Gestation	Kuriyama et coll., 2005
Anomalies morphologiques Distance anogénitale Âge à la séparation du prépuce	Rat Wistar	BDE 71 ; gavage : 30 et 60 Période pubertaire BDE 99 ; gavage : 1ou 10 Gestation	Stoker et coll., 2004 Lilienthal et coll., 2006
Altérations des taux hormonaux Testostérone Œstradiol	Rat Long-Evans	BDE 99 ; 1 ou 10 Gestation	Lilienthal et coll., 2006

Congénères isolés

BDE 209

Deux études ont concerné le 2,2', 3,3', 4,4', 5,5', 6,6'-décabromodiphényléther (BDE 209), deuxième retardateur de flamme le plus utilisé parce qu'il est considéré comme moins toxique que d'autres (mais cette donnée est controversée).

Dans une première étude (Tseng et coll., 2006), il a été examiné si une exposition au BDE 209 avait un effet négatif sur l'histologie testiculaire et les spermatozoïdes de souris CD-1. Les souris ont été réparties en 5 groupes d'exposition, le composé étant administré par gavage à la dose de 0, 10, 100, 500 et 1 500 mg/kg de la fin de la lactation à l'âge adulte (21 à 70 jours postnatals). Il a été trouvé pour les deux fortes doses que le BDE 209 réduisait le potentiel membranaire mitochondrial (MMP) des spermatozoïdes épididymaires et l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH) et qu'il induisait la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les spermatozoïdes de souris sexuellement matures, sans affecter le nombre de spermatozoïdes, leur motilité, le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux, et les autres paramètres du mouvement (VCL, VAP, VSL, BCF)[21] obtenus par un système CASA (*computer assisted sperm analysis*), la dénaturation de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA), la production d'anion superoxyde ($O_2^{-\cdot}$), le contenu en ADN des cellules dans le testicule, ainsi que l'histopathologie des testicules. Du fait de l'association trouvée entre ALH, MMP et la production de H_2O_2, les auteurs suggéraient que l'action reprotoxique d'une exposition au BDE 209 serait due à un stress oxydatif induit.

Dans la seconde étude, ont été recherchés les effets de l'exposition prénatale à ce composé sur les organes reproducteurs, le développement neuronal et les niveaux de plusieurs hormones chez des rats exposés *in utero*, la mère ayant été exposée aux doses de 5, 40 ou 320 mg/kg de J6 à J18 post-conception (Kim et coll., 2009). Les taux de testostérone chez le mâle n'étaient pas affectés. Les auteurs rapportent par ailleurs une diminution significative du gain de poids corporel chez les descendants mâles exposés à la plus forte dose, ainsi qu'une augmentation importante de poids de la thyroïde et une diminution du poids des surrénales. La concentration de thyroxine (T4) était significativement plus faible chez la progéniture femelle exposée à 42 jours postnatals, l'effet étant plus prononcé pour le groupe exposé aux doses les plus élevées.

BDE 99

Deux études concernent le BDE 99. Dans la première étude (Kuriyama et coll., 2005), les auteurs ont évalué les effets de l'exposition sur les niveaux de base de d'activité motrice chez le jeune et les capacités reproductrices des

21. VCL : vitesse curvilinéaire de la tête ; VAP : vitesse selon la trajectoire moyenne ; VSL : vitesse de progression linéaire ; BCF : fréquence de croisement de la trajectoire

mâles adultes. Des femelles gestantes ont été traitées par gavage au 6e jour de la gestation avec une dose unique de 60 ou 300 µg/kg. L'activité locomotrice basale de la progéniture a été évaluée à J36 et J71, et les capacités de reproduction des mâles à J140. L'exposition à la faible dose a provoqué une hyperactivité chez les descendants. Il existait par ailleurs une diminution de la spermatogenèse (réserve testiculaire et épididymaire) chez l'adulte. Les auteurs mentionnent que les doses utilisées dans cette étude sont compatibles avec les estimations des niveaux d'exposition chez l'homme et qu'il s'agit de la plus faible dose de PBDE signalée à ce jour avoir un effet toxique *in vivo* chez le rongeur.

Dans la seconde étude, les possibles effets d'une exposition *in utero* au BDE 99 sur les niveaux d'hormones, le développement sexuel et les comportements sexuels chez les progénitures mâles et femelles ont été étudiés (Lilienthal et coll., 2006). Les rates gestantes ont été exposées aux concentrations de 1 ou 10 mg/kg/j au BDE 99 du jour 10 au jour 18 de la gestation. Pour la descendance mâle, l'exposition aux PBDE entraînait une diminution significative de la testostérone et de l'œstradiol au sevrage et à l'âge adulte. De plus, la distance anogénitale était réduite. Le déclenchement de la puberté était légèrement accéléré chez le mâle pour la dose faible. La préférence au sucré était augmentée de manière dose dépendante chez le mâle adulte exposé au BDE 99 indiquant une féminisation de ce comportement sexuellement dimorphique. Les plus fortes concentrations de PBDE dans les tissus des mères et des fœtus ont été observées pour le jour de gestation 19. Les auteurs ont conclu que les PBDE sont des composés actifs lors d'une exposition gestationnelle qui peuvent donc interférer avec le développement, le comportement sexuel et le dimorphisme sexuel.

HBCD

Le retardateur de flamme HBCD a été testé sur une génération de rats Wistar avec des doses de 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 et 100 mg/kg/j chez les rats mâles (10 semaines) et femelles (2 semaines) avant l'accouplement, et ce jusqu'à la fin de la lactation, puis chez leur progéniture, à partir du sevrage jusqu'au moment du sacrifice à l'âge adulte (Van der Ven et coll., 2009). Les effets ont été évalués dans la génération F1. Les foies de ces animaux avaient des niveaux augmentés de HBCD proportionnels aux doses administrées. La densité minérale de l'os trabéculaire du tibia était diminuée de manière dose dépendante chez les femelles. La réponse immunitaire provoquée était augmentée chez le mâle. De plus, il existait une diminution du poids des testicules à partir d'expositions entre 1 et 3 mg/kg/j (BMDL=1,5). L'activité CYP19/aromatase dans l'ovaire était corrélée à la concentration de HBCD dans le foie. Les auteurs concluaient que les effets observés avec des doses relativement faibles peuvent susciter des inquiétudes pour la santé humaine.

Une autre étude de type réglementaire sur deux générations (Ema et coll., 2008), a analysé les possibles effets du même composé HBCD chez des rats

mâles et femelles exposés par voie orale à 0, 150, 1 500 ou 15 000 mg de HBCD par kg de nourriture dès 10 semaines avant le premier accouplement et ce jusqu'à la fin de la lactation pour les deux générations. La moyenne journalière des apports correspondait à 10,2, 101 et 1 008 mg/kg chez les mâles F0, 14,0, 141 et 1 363 mg/kg chez les femelles F0, 11,4, 115 et 1 142 mg/kg chez les mâles F1, et 14,3, 138 et 1 363 mg/kg chez les femelles F1 pour 150, 1 500 et 15 000 mg/kg de nourriture, respectivement. Sur le plan de la fonction de reproduction, les auteurs ont simplement montré un nombre de follicules primordiaux dans l'ovaire des femelles F1 diminué pour l'exposition à 1 500 mg/kg de nourriture et plus (voir plus bas). Par ailleurs, le nombre de rats présentant une diminution de la taille des follicules thyroïdiens a été trouvé augmenté en F0 et en F1 chez les mâles et les femelles exposés à 101-115 mg/kg /j et plus de HBCD. Les taux sériques de TSH étaient augmentés chez les femelles de F0 et de F1 pour les deux doses élevées, et les niveaux de T4 sérique étaient diminués chez les mâles et les femelles de F0 exposés à la plus forte concentration. Il y avait une augmentation du poids du foie chez les mâles adultes et les progénitures des deux sexes au sevrage pour les expositions à 101-115 mg/kg et plus, et chez les femelles adultes à 1 363 mg/kg/j et de la thyroïde chez les adultes mâles et femelles à 1 008-1 363 mg/kg/j. Pour la dose la plus forte, une diminution de la croissance pondérale associée à une réduction de la consommation de nourriture a été trouvée chez les mâles et femelles de F1. Une diminution de la viabilité des petits en F2 et du poids corporel des mâles en F1, et des petits mâles et femelles de F2 a été observée avec la dose maximale. Au total, les données indiquaient que le NOAEL de HBCD dans cette étude était de 10,2 mg/kg/j. Les auteurs concluaient que l'exposition humaine à HBCD est bien en dessous du NOAEL trouvé dans leur étude.

Mélange de congénères

Penta-BDE (DE-71)

Stoker et coll. (2004) ont testé l'effet d'un mélange commercial de polybromés (penta-BDE, DE-71), sur la fonction thyroïdienne et les éventuels impacts indirects avec différents critères d'évaluation de paramètres du système reproducteur chez le rat lors de la période pubertaire. Les rats ont été gavés avec 0, 3, 30 ou 60 mg/kg/j de J23 à J53. Les effets du DE-71 sur les enzymes hépatiques et les hormones thyroïdiennes ont été mesurés dans un autre groupe de mâles après seulement 5 jours de traitement (J23-28). Les doses de 3, 30 et 60 mg/kg diminuaient T4 chez les mâles. T3 et TSH étaient élevées pour les doses 30 et 60 mg. Parmi les tissus/organes androgénodépendants, les auteurs notaient une diminution du poids des vésicules séminales et de la prostate ventrale après l'exposition de 31 jours à la dose de 60 mg/kg/j. Le jour de séparation du prépuce (PPS ; considéré comme marquant le début de la puberté) était considérablement retardé avec les doses de 30 et 60 mg/kg/j.

Études chez l'animal femelle

Essentiellement deux organes ont été étudiés chez la femelle de rongeurs, l'ovaire et l'utérus (tableau 45.II), avec une étude récente sur la glande mammaire. À part une ou deux études de mesure d'expression de gènes par PCR quantitative, toutes les autres consistent en des mesures de poids d'organes et d'histologie. On distinguera l'exposition à des congénères isolés de celle à des mélanges.

Tableau 45.II : Paramètres phénotypiques affectés dans les études

Paramètres phénotypiques	Espèce/Lignée	Composé Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids ovaires, utérus	Rate Wistar Rate Long-Evans	BDE 47 ; orale (eau de boisson) : 0,140 ou 0,7 ; Gestation BDE 99 ; SC : 1-10 ; Gestation/lactation	Ceccatelli et coll., 2006 Talsness et coll., 2008
Modification des follicules	Rate Crl:CD(SD) Rate Long-Evans Rate Wistar	HBCD ; Gavage : 141 et 1 363 avant accouplement/ gestation /fin de la lactation BDE 99 ; SC : 1-10 Gestation BDE 47 ; Orale (boisson) : 0,7 Gestation	Lilienthal et coll., 2006 Ema et coll., 2008 Talsness et coll., 2008
Puberté Ouverture vaginale	Rate Long-Evans Rate Wistar	BDE 99 ; SC : 1-10 ; Gestation DE-71 ; Gavage : 60 Période pubertaire	Stoker et coll., 2004 Lilienthal et coll., 2006
Altérations des taux hormonaux Œstradiol	Rates Wistar Rates Sprague-Dawley	BDE 47 ; Orale (boisson) : 0,7 Gestation BDE 209 ; Gavage : 5 Gestation	Talsness et coll., 2008 Kim et coll., 2009

SC : voie sous-cutanée

Congénères isolés

BDE 99

Dans une première étude, il a été administré une dose unique de 60 µg ou 300 µg de BDE 99/kg de poids, doses supposées représenter les concentrations retrouvées dans l'espèce humaine, à des rates Wistar au jour 6 de leur gestation. L'analyse histologique des ovaires, du vagin et de l'utérus a été pratiquée

sur les descendantes femelles âgées de 90 jours. Les follicules ont été comptés et des études de microscopie électronique ont été menées. Il en ressort la mise en évidence de changements ultrastructuraux compatibles avec une morphologie altérée des mitochondries dans les ovaires. Il n'y a aucun changement ni des autres organes analysés ni du nombre de follicules. Il est observé un pourcentage accru de résorption embryonnaire chez les descendantes traitées par rapport aux témoins (Talsness et coll., 2005).

Dans une deuxième étude de la même équipe, des rates gestantes Long-Evans ont été exposées du jour 10 à 18 de gestation à 1 ou 10 mg/kg de BDE 99 par injection sous-cutanée. Les descendantes femelles présentaient une puberté légèrement retardée quand traitées *in utero* aux doses les plus élevées. Le comptage des follicules dans les ovaires adultes de ces descendantes révèle un nombre de follicules primordiaux/primaires réduit chez les animaux exposés aux faibles doses tandis qu'une diminution des follicules secondaires est observée aux doses les plus élevées (Lilienthal et coll., 2006).

L'effet sur l'utérus, suite à une exposition *in utero* au BDE 99 (1 ou 10 mg/kg/jour) de rates Long Evans gestantes injectées en sous-cutané du jour 10 à 18 de gestation, a été rapporté par Ceccatelli et coll. (2006). Les descendantes étudiées à l'âge adulte ne présentaient pas de différence de poids de l'utérus quel que soit le traitement, mais les poids absolu et relatif des ovaires étaient faiblement et significativement augmentés. L'analyse de l'expression de plusieurs gènes cibles des œstrogènes exprimés dans l'utérus, montrait une altération. Parmi ceux-ci, le niveau d'ARN messager du gène codant le récepteur à la progestérone est diminué aux deux doses de BDE 99 utilisées, tandis que le niveau d'ARNm des récepteurs alpha et bêta des œstrogènes ainsi que celui d'IGF-1 est fortement augmenté à la dose la plus faible. Cependant, il n'est pas clair si les changements d'expression de gènes observés dans cette étude résultent de l'exposition *in utero* ou de celle après la naissance ou encore des deux, car du BDE 99 a été retrouvé dans le sang et le tissu adipeux des animaux à l'âge adulte.

Ces résultats montrent également qu'il faut aller plus loin que la simple analyse histologique et pesage des organes pour mettre en évidence des altérations importantes au sein des tissus.

BDE 47

L'équipe allemande ayant publié les études sur le BDE 99 a testé l'effet de l'exposition *in utero* et au cours de la lactation d'une administration unique dans l'eau de boisson de 140 ou 700 µg/kg de BDE 47 sur des rates gestantes Wistar au 6e jour de gestation. Les descendantes femelles ont été étudiées à 38 et 100 jours après la naissance. Dans le groupe des animaux âgés de 38 jours et exposés à 140 µg/kg, il a été noté une diminution du poids des ovaires bien qu'aucune altération histologique n'ait été mise en évidence. Chez les animaux exposés à la dose la plus forte, on note une diminution des follicules secondaires et tertiaires et une diminution des niveaux d'œstradiol bien que

l'activité de l'aromatase soit équivalente entre les animaux témoins et traités. À 100 jours, aucune différence n'est observable entre les ovaires traités et les témoins (Talsness et coll., 2008). On peut donc supposer que les effets sont réversibles au cours du temps.

Des rates immatures ont également été utilisées pour tester l'implication du BDE 47 dans l'induction potentielle de la calbindin-D9k (CaBP-9k), qui est un biomarqueur permettant de tester l'activité des composés œstrogéniques. Commençant au jour 16 postnatal, le BDE 47 a été administré pendant 3 jours. Le traitement avec une forte dose de BDE 47 (200 mg/kg/j) entraînait une augmentation significative des ARNm et de la protéine CaBP-9k, 24 h après injection, tandis que l'augmentation est moindre avec les doses moyennes et faibles (50 et 100 mg/kg/j). De plus, le traitement avec une forte dose de BDE 47 induit un effet utérotrophique (gain de poids de l'utérus). Le co-traitement avec ICI 182,780, un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes inverse complètement l'augmentation de poids de l'utérus induite par le BDE 47 ainsi que l'augmentation de CaBP-9k. Ces résultats indiquent que les effets du BDE 47 sur l'utérus pourraient être médiés via la signalisation des récepteurs aux œstrogènes (Dang et coll., 2007).

BDE 209

Une seule étude (Kim et coll., 2009) rapporte les effets d'une exposition au BDE 209 chez la femelle. Dans cette étude, des rats Sprague-Dawley sont exposés *in utero* du jour 6 au jour 18 de gestation à des doses de 5, 40 ou 320 mg/kg /j de BDE 209. Les auteurs observent pour la dose la plus forte, une augmentation significative du poids de la thyroïde et une diminution de celui des surrénales chez les descendants femelles. À faible dose de BDE 209 (5 mg/kg), il est observé une réduction de la concentration sérique d'œstradiol chez les femelles à l'âge adulte.

HBCD

L'étude d'Ema et coll. (2008), déjà citée plus haut, s'est également intéressée aux femelles. Il est rapporté que l'examen histologique des ovaires des femelles F1 révèle une diminution d'un tiers du nombre des follicules primordiaux constituant la réserve des follicules de l'ovaire, aux doses de 1 500 et 15 000 mg/kg de nourriture (soit 141 et 1 363 mg/kg de poids corporel). Cette observation indique que l'HBCD peut avoir un effet reprotoxique car une diminution du nombre de follicules primordiaux est considérée comme un biomarqueur des effets adverses sur la reproduction femelle, car non réversible. Cependant, ces animaux femelles ont un nombre normal d'implantations au cours de leur première gestation. Il aurait été intéressant de mener une étude sur les capacités de reproduction au cours du temps, sur une période plus longue de la vie de l'animal pour voir si la diminution de la réserve entraînait une insuffisance ovarienne précoce.

Mélange de congénères

Penta-BDE (DE-71)

Une étude menée chez le rat Long-Evans du jour 6 de gestation jusqu'au sevrage a montré qu'un mélange commercial de PBDE (penta-BDE, DE-71) donné par voie orale aux doses de 1,7, 10,2 et 30,6 mg/kg/j induisait des altérations de la fonction de reproduction. Chez les descendantes femelles, le développement de la glande mammaire est réduit à 21 jours postnatals suite à une exposition au DE-71 (10,2 et 30,6 mg/kg) (Kodavanti et coll., 2010).

Stoker et coll. (2004) ont testé l'effet du même mélange DE-71 sur la fonction thyroïdienne et les éventuels impacts indirects avec différents critères d'évaluation de paramètres du système reproducteur chez le rat lors de la période pubertaire femelle. Les rates ont été gavées avec 0, 3, 30 ou 60 mg/kg/j de J22 à J41. Les effets du DE-71 sur les enzymes hépatiques et les hormones thyroïdiennes ont été mesurés dans un autre groupe de femelles après seulement 5 jours de traitement (J21-26). Les concentrations sériques de T4 étaient significativement réduites avec les deux doses les plus élevées. La dose de 60 mg/kg entraînait également un retard important de l'âge de l'ouverture vaginale (début de la puberté).

Autres effets en marge du domaine couvert par la présente expertise

La structure chimique des PBDE et de leurs métabolites est voisine de celle des hormones thyroïdiennes. La réduction des taux d'hormones thyroïdiennes circulantes est le seul effet reproductible démontré sur les animaux exposés aux fortes doses (Zhou et coll., 2001 ; Hallgren et coll., 2002 ; Donahue et coll., 2004 ; Ulbrich et coll., 2004).

Des études évaluant les effets toxiques de divers polluants de type PBDE sur la stéroïdogenèse ont montré que ces derniers sont rapidement absorbés et distribués à l'intérieur des organes riches en lipides. Chez les rats, l'administration orale de 2,2 mg/rat de BDE 99 radiomarqué conduit à une importante accumulation de ce composé dans la glande surrénale, se retrouvant le 2e organe le plus affecté après le tissu épididymaire (Hakk et coll., 2002).

Kuriyama et coll. (2007) ont mesuré les concentrations d'hormones thyroïdiennes, les activités des enzymes hépatiques et la concentration tissulaire de BDE 99 chez des rats Wistar après traitement par gavage au 6e jour de gestation avec une dose unique de 60 ou 300 µg/kg (même protocole que l'étude de 2005, citée plus haut). L'analyse de la concentration tissulaire BDE 99 a confirmé la persistance de ce composé qui était détecté dans le tissu adipeux 37 jours après l'exposition. La plus forte dose réduisait la concentration de T4 chez la progéniture en début de lactation (J1), une diminution plus

faible (non significative) étant également observée à J22. Il avait précédemment été montré dans plusieurs études que les PBDE peuvent réduire les concentrations de T4, mais cette étude était la première démontrant la perturbation endocrinienne à faibles doses. La concentration de BDE 99 mesurée dans le tissu adipeux était proche de celles rapportées chez l'homme non exposé professionnellement. En outre, les auteurs rappelant les résultats de leur étude précédente (baisse de la production spermatique chez l'adulte) évoquait le possible lien entre les modifications thyroïdiennes chez le jeune et les effets reproductifs (et neurologiques) observés à distance.

En conclusion, des effets tels qu'une modification des distances anogénitales chez le mâle, un retard pubertaire dans les deux sexes, une diminution de la production spermatique et des taux de testostérone, une modification de certains paramètres fonctionnels spermatiques ou encore une diminution du nombre de follicules ovariens, ont été observés après exposition gestationnelle ponctuelle ou exposition pubertaire et adulte avec les composés BDE 99 et 209, avec cependant des doses utilisées qui semblent très supérieures aux expositions estimées chez l'homme. Les effets délétères sur la fonction thyroïdienne peuvent alerter sur le possible impact indirect sur la fonction de reproduction compte tenu des interrelations entre ces deux fonctions bien que les rares études disponibles ne mettent pas en évidence de lien pertinent entre les paramètres modifiés. L'étude de Van der ven et collaborateurs de 2009, avec une exposition de type chronique à des doses relativement faibles de HBCD, mettait en évidence des effets délétères sur plusieurs organes/tissus régulés par les hormones faisant suggérer que ce type d'exposition représente un danger potentiel pour l'homme.

Il convient de développer d'autres modèles plus pertinents pour l'espèce humaine et d'utiliser des modes d'administration plus adaptés aux conditions réelles d'exposition humaine qu'une injection sous-cutanée unique d'une forte dose d'un seul congénère. Il est également important de développer des approches moléculaires plus fines pour mieux évaluer les perturbations induites par les différentes expositions. Enfin, comme le montre la seule étude longitudinale, il est important d'évaluer les effets au cours du temps car des phénomènes d'adaptation (de récupération) peuvent avoir lieu.

Bibliographie

CECCATELLI R, FAASS O, SCHLUMPF M, LICHTENSTEIGER W. Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenylether PBDE 99 and PCB. *Toxicology* 2006, **220** : 104-116

DANG VH, CHOI KC, JEUNG EB. Tetrabromodiphenyl ether (BDE 47) evokes estrogenicity and calbindin-D9k expression through an estrogen receptor-mediated pathway in the uterus of immature rats. *Toxicol Sci* 2007, **97** : 504-511

DONAHUE DA, DOUGHERTY EJ, MESERVE LA. Influence of a combination of two tetrachlorobiphenyl congeners (PCB 47; PCB 77) on thyroid status, choline acetyltransferase (ChAT) activity, and short- and long-term memory in 30-day-old Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2004, **203** : 99-107

EMA M, FUJII S, HIRATA-KOIZUMI M, MATSUMOTO M. Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod Toxicol* 2008, **25** : 335-351

HAKK H, LARSEN G, KLASSON-WEHLER E. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotica* 2002, **32** : 369-382

HALLGREN S, DARNERUD P. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 2002, **177** : 227-243

KIM TH, LEE YJ, LEE E, KIM MS, KWACK SJ, coll. Effects of gestational exposure to decabromodiphenyl ether on reproductive parameters, thyroid hormone levels, and neuronal development in Sprague-Dawley rats offspring. *J Toxicol Environ Health A* 2009, **72** : 1296-1303

KODAVANTI PR, COBURN CG, MOSER VC, MACPHAIL RC, FENTON SE, coll. Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71 : neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects. *Toxicol Sci* 2010, **116** : 297-312

KURIYAMA SN, TALSNESS CE, GROTE K, CHAHOUD I. Developmental exposure to low dose PBDE 99 : effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environ Health Perspect* 2005, **113** : 149-154

KURIYAMA SN, WANNER A, FIDALGO-NETO AA, TALSNESS CE, KOERNER W, CHAHOUD I. Developmental exposure to low-dose PBDE-99 : tissue distribution and thyroid hormone levels. *Toxicology* 2007, **242** : 80-90

LILIENTHAL H, HACK A, ROTH-HÄRER A, GRANDE SW, TALSNESS CE. Effects of developmental exposure to 2,2 ,4,4 ,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect* 2006, **114** : 194-201

SMALL CM, DECARO JJ, TERRELL ML, DOMINGUEZ C, CAMERON LL, WIRTH J, MARCUS M. Maternal exposure to a brominated flame retardant and genitourinary conditions in male offspring. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1175-1179

STASKAL DF, DILIBERTO JJ, DEVITO MJ, BIRNBAUM LS. Toxicokinetics of BDE 47 in female mice : effect of dose, route of exposure, and time. *Toxicol Sci* 2005, **83** : 215-223

STOKER TE, LAWS SC, CROFTON KM, HEDGE JM, FERRELL JM, COOPER RL. Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicol Sci* 2004, **78** : 144-155

TALSNESS CE, SHAKIBAEI M, KURIYAMA SN, GRANDE SW, STERNER-KOCK A, coll. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol Lett* 2005, **157** : 189-202

TALSNESS CE, KURIYAMA SN, STERNER-KOCK A, SCHNITKER P, GRANDE SW, coll. In utero and lactational exposures to low doses of polybrominated diphenyl ether-47

alter the reproductive system and thyroid gland of female rat offspring. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 308-314

TSENG LH, LEE CW, PAN MH, TSAI SS, LI MH, coll. Postnatal exposure of the male mouse to 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabrominated diphenyl ether : decreased epididymal sperm functions without alterations in DNA content and histology in testis. *Toxicology* 2006, **224** : 33-43

ULBRICH B, STAHLMANN R. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) : a systematic review of experimental data. *Arch Toxicol* 2004, **78** : 252-268

VAN DER VEN LT, VAN DE KUIL T, LEONARDS PE, SLOB W, LILIENTHAL H, coll. Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicol Lett* 2009, **185** : 51-62

ZHOU T, ROSS DG, DEVITO MJ, CROFTON KM. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicol Sci* 2001, **61** : 76-82

46
Effets cellulaires et tissulaires

Peu d'études sont disponibles sur les effets cellulaires ou tissulaires des polybromés. Seul le TBBPA a été analysé sur les tissus mâles. Des mélanges de PBDE ont été testés sur des cellules issues de follicules ou des lignées de cellules de cancer du sein.

Effets sur les cellules du testicule

Les effets *in vitro* du TBBPA sur les cellules de Sertoli de souris TM4 ont été étudiés (Ogunbayo et coll., 2008). Les auteurs ont montré que le TBBPA provoquait une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans un intervalle de concentrations de 5 à 60 µM (concentration efficace 50 % : CE_{50}=21 µM). De plus, le TBBPA provoquait une mort cellulaire (concentration létale 50 % : CL_{50}=18 µM) en partie par apoptose, impliquant une dépolarisation mitochondriale Ca^{2+} dépendante. Les études sur les transporteurs intracellulaires de Ca^{2+} montrent que le TBBPA peut inhiber la Ca^{2+}-ATPase du reticulum sarcoplasmique/endoplasmique (Serca) à de faibles concentrations (concentration inhibitrice 50 % : CI_{50} de 0,4 à 1,2 µM). Les auteurs suggèrent que les effets cytotoxiques du TBBPA sur les cellules sont partiellement dus à un dérèglement de la signalisation Ca^{2+}, par une atteinte directe des protéines de transport de Ca^{2+}. Il est cependant clair que les effets aigus du TBBPA sur les cellules de Sertoli se produisent pour une gamme de concentration environ 100 fois plus élevée que les plus hauts niveaux de TBBPA mesurés chez l'homme. On ne sait pas si une exposition chronique à des niveaux beaucoup plus bas de TBBPA pourrait également compromettre les fonctions cellulaires par les mécanismes mis en évidence dans ce travail.

Effets sur les cellules de la thèque et de granulosa de l'ovaire

Des cellules de granulosa et des cellules de la thèque issues de follicules prélevés sur des truies prébubères ont été cultivées *in vitro* avec un mélange de foies de barbots prélevés dans le lac Mjosa en Norvège. Ce mélange de

polluants environnementaux contient essentiellement des PBDE et des HBCD. Cet extrait est utilisé à la concentration de 1,4 µg/ml. Les surnageants de culture sont analysés après 48 h. Cette étude montre que le mélange Mjosa est un inducteur du récepteur bêta des œstrogènes et qu'il a un effet stimulateur sur la sécrétion des œstrogènes basale et induite par la FSH. Cette stimulation se fait par une augmentation de l'activité de l'aromatase (Gregoraszcuk et coll., 2009).

La même équipe polonaise a étudié l'effet d'un mélange de différentes concentrations (faibles, moyennes et fortes) de PBDE (BDE 47, BDE 99, BDE 100, BDE 209) sur des cellules isolées ou des co-cultures de cellules de granulosa et de thèques provenant de truies cycliques dont les ovaires ont été récupérés à l'abattoir. Les cellules sont cultivées pendant 24 h ou 48 h avec le mélange puis les milieux sont changés et les cellules cultivées sans PBDE pendant 48 h afin d'évaluer la réversibilité des effets. Après 24 h de culture, seules les doses les plus faibles (0,5 ; 0,25 ; 0,1 ; 0,05 ng/ml) induisent une sécrétion augmentée de tous les stéroïdes dosés (progestérone, testostérone et œstradiol) tandis qu'après 48 h la stimulation de la sécrétion d'œstradiol et de testostérone est observée pour les doses faibles et moyennes.

Il est également montré une augmentation de la sécrétion de progestérone (P4) aux doses les plus faibles quel que soit le temps de culture. Il en résulte une modification des ratios P4/T et T/E2 qui pourrait engendrer une lutéïnisation prématurée des follicules pré-ovulatoires. Il est également à noter qu'il n'est pas possible de restaurer des dosages normaux après suppression des mélanges de PBDE dans le milieu (Karpeta et Gregoraszczuk, 2010).

Effets sur des cellules mammaires

Des cellules MCF-7 issues de tumeurs mammaires humaines, sensibles aux œstrogènes, ont été utilisées pour tester la capacité œstrogénique du mélange penta-BDE (DE-71). Il a été montré que le DE-71 augmente la prolifération des cellules MCF-7, cet effet peut être prévenu par traitement par un anti-œstrogène (ICI) suggérant que l'effet du DE-71 est médié par un récepteur aux œstrogènes. Cependant, le mélange DE-71 possède un faible potentiel œstrogénique (Mercado-Feliciano et coll., 2008).

Autres effets en marge du domaine couvert par la présente expertise

Hamers et coll. (2008) ont étudié, sur des microsomes hépatiques de rat exposés au tri-BDE 47 (25 µM), différents effets biologiques de type perturbateur endocrinien induits par les produits de biotransformation hydroxylés de

ce composé. Les résultats ont notamment montré une compétition de ces métabolites avec la thyroxine pour la liaison à la transthyrétine (TTR), et dans une moindre mesure une inhibition de l'œstradiol sulfotransférase (E2SULT). Considérant ces métabolites de façon individuelle, ces effets sont apparus très significativement supérieurs à ceux observés pour le composé parent (BDE 47), ceci d'un facteur 160 à 1 600 pour la compétition avec l'hormone thyroïdienne et d'un facteur 2 à 200 pour l'inhibition de l'œstradiol sulfotransférase.

En conclusion, quelques études *in vitro* semblent indiquer que les PBDE pourraient avoir un effet sur la stéroïdogenèse des cellules des follicules ovariens et de glandes mammaires en agissant via le récepteur des œstrogènes. Les pistes ouvertes méritent d'être explorées grâce notamment à des analyses moléculaires plus fines. Une étude sur les cellules de Sertoli de souris montre des effets de dérégulation de la signalisation Ca^{++} à des concentrations 100 fois supérieures à celles mesurées chez l'homme. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être reproduits et confirmés.

Bibliographie

GREGORASZCZUK EL, PTAK A, SKAARE JU, MULARZ K, CHMIELOWIEC A, coll. Mechanisms of action of two different natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) in ovarian follicles. *Xenobiotica* 2009, **39** : 80-89

HAMERS T, KAMSTRA JH, SONNEVELD E, MURK AJ, VISSER TJ, coll. Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47). *Mol Nutr Food Res* 2008, **52** : 284-298

KARPETA A, GREGORASZCZUK E. Mixture of dominant PBDE congeners (BDE-47, -99, -100 and -209) at levels noted in human blood dramatically enhances progesterone secretion by ovarian follicles. *Endocr Regul* 2010, **44** : 49-55

MERCADO-FELICIANO M, BIGSBY RM. The polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 is mildly estrogenic. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 605-611

OGUNBAYO OA, LAI PF, CONNOLLY TJ, MICHELANGELI F. Tetrabromobisphenol A (TBBPA), induces cell death in TM4 Sertoli cells by modulating Ca2+ transport proteins and causing dysregulation of Ca2+ homeostasis. *Toxicol In Vitro* 2008, **22** : 943-952

47
Études chez les poissons et les amphibiens

Comme dans le cas des mammifères, relativement peu d'études ont encore été consacrées aux effets des RFB sur les poissons et les amphibiens. En termes d'espèces, c'est le zebrafish (*Danio rerio*) qui a été le plus largement utilisé, mais d'autres espèces comme le medaka (*Oryzias latipes*), le vairon (*Pimephales promelas*), le barbeau (*Barbus graellsii*), le flet (*Platichthys flesus*) ou les salmonidés ont été étudiées plus marginalement. Chez les amphibiens, de nombreuses études ont été menées chez *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* et sur plusieurs espèces de grenouilles. Ces études se sont concentrées sur la métamorphose et donc sur l'interférence avec les hormones thyroïdiennes. Devant le nombre de molécules différentes testées, les protocoles d'exposition utilisés et les différentes espèces choisies, il est encore difficile d'avoir une vue globale de la gamme d'effets générés par ces produits.

Effets sur la reproduction

Les effets des retardateurs de flammes sur la reproduction ne semblent pas majeurs, d'après les quelques études qui ont été publiées, qui rapportent des résultats contradictoires.

Un certain nombre de travaux indiquent des effets faibles ou carrément négatifs des PBDE seuls ou en mélange sur la reproduction. Ainsi, Kuiper et coll. (2008) ont traité des flets et des zebrafish adultes avec du penta-BDE (DE-71), les modes d'exposition étant via la nourriture (zebrafish, flet) et/ou via le sédiment (flet). Les doses cumulées retrouvées dans les animaux traités varient de 0,10 à 71 µg/g de poids sec. Aucun changement histopathologique n'a été observé au niveau des gonades des poissons traités ; aux plus fortes doses, une légère baisse de la production des œufs et de la survie larvaire est rapportée mais sa significativité n'est pas évidente. Dans une étude similaire, les mêmes auteurs rapportent une légère augmentation de l'activité aromatase, mais aucun effet sur la production de vitellogénine (Kuiper et coll., 2007b). Les auteurs concluent à un risque limité de ce mélange en termes de reprotoxicité des poissons aux doses retrouvées dans l'environnement. Les effets du BDE 47 sur le zebrafish ont été étudiés par Chou et coll. (2010) : le

composé a été administré via la nourriture depuis la période juvénile (21 jours après la naissance) jusqu'au jour 90. Des doses de 2,7 à 409 ng/g de tissus ont été mesurées chez les poissons traités mais aucun effet sur la fertilité, la taille des animaux ou leur taux de survie n'a été observé. L'histologie des gonades était normale.

Ces données contrastent avec celles de Muirhead et coll. (2006) qui ont traité des medaka et des vairons avec du BDE 47. Le type d'exposition a été différent chez les deux espèces, les medaka ayant reçu une dose unique oralement alors que les vairons ont été traités chaque jour pendant 25 jours. Dans les deux cas, le BDE 47 a été encapsulé dans des crustacés (*Artemia salina*) utilisés comme source de nourriture pour les poissons dans lesquels des doses significatives de BDE 47 ont été retrouvées (60 µg/g chez les femelles de vairon, 15 µg/g chez les mâles). Les femelles de vairon ont arrêté de produire des œufs après 10 jours d'exposition et globalement ont montré une production d'œufs inférieure à celle des témoins. Par ailleurs, les mâles présentaient une réduction de 50 % de la quantité de sperme mature comparés aux poissons non traités. De façon similaire, Kuiper et coll. (2007a) ont observé un effet reprotoxique du TBBPA chez le zebrafish. Dans cette étude, les poissons ont été traités pendant 30 jours à des doses allant jusqu'à 1,5 µM dans l'eau et les embryons issus de ces animaux traités ont été exposés aux mêmes concentrations jusqu'à 47 jours après l'éclosion. La production des œufs par les poissons traités (0,047 µM) est diminuée et l'histologie des ovaires révèle un accroissement des ovocytes prématures. L'éclosion des embryons traités est également diminuée et ces embryons présentent des anomalies morphologiques. De façon intéressante, les embryons traités montraient une dominance des femelles. Ces données suggèrent donc un effet reprotoxique prononcé dans les deux sexes ; la raison des différences avec les études précédentes n'est pas clarifiée.

Effets sur l'axe thyroïdien

Comme certains retardateurs de flamme bromés sont capables d'interagir avec la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes chez les mammifères, plusieurs études menées chez les poissons ont étudié cette voie de signalisation. Ainsi, Kuiper et coll. (2007b) ont exposé de façon chronique au TBBPA ou HBCD des flets à des concentrations environnementales pertinentes (0,54 à 435 ng/ml de TBBPA ; 0,3 à 3 000 µg/g de nourriture pour le HBCD). Aucun effet évident sur des paramètres reproductifs n'a été observé mais ces auteurs ont noté une augmentation de la T4 plasmatique (mais pas de la T3) sans qu'ils ne puissent noter une altération histologique de la thyroïde. En utilisant le BDE 47 ajouté à la nourriture (2,4 ou 12,3 µg/g/j) de vairons pendant 21 jours, Lema et coll. (2008) ont décrit toute une série d'anomalies de l'axe thyroïdien : diminution de T4 plasmatique accompagnée par une augmentation de TSHβ dans l'hypophyse. Au niveau des récepteurs, les

auteurs observent une augmentation d'expression des transcripts TRα dans le cerveau des femelles et une diminution de TRβ dans le cerveau des deux sexes. Finalement, Yu et coll. (2010) observent que le penta-BDE (DE-71) à 1, 3 ou 10 µg/l dans l'eau à partir de la fécondation et pendant 14 jours induit une diminution de la T4 et une augmentation du CRH (qui joue le rôle de TRH) et de TSHβ d'une façon dose dépendante. La transcription de gènes impliqués dans la synthèse de ces hormones (thyroglobuline, transporteur d'iode) et la transcription de gènes impliqués dans le développement de la thyroïde a été augmentée chez les poissons traités. De même, l'expression de deux déiodinases a été observée en augmentation par rapport aux témoins, les récepteurs étant pour leur part non affectés.

Chez les amphibiens, la quasi-totalité des études se sont concentrées sur les effets des retardateurs de flammes sur l'induction de la métamorphose. Comme celle-ci est induite par les hormones thyroïdiennes, cela a conduit les auteurs à discuter des interférences possibles entre ces molécules et la voie de signalisation de ces hormones. Ainsi, les BDE 47 et 99 ont été administrés via la nourriture à des têtards de *X. tropicalis* prémétamorphiques au stade 54 (Carlsson et coll., 2007). À une dose de 1 mg/g de nourriture, les deux composés sont toxiques et les têtards montrent un poids et une longueur plus faibles que les témoins. De plus, une réduction de paramètres de métamorphose a été observée, notamment sur les têtards traités au BDE 99. Des effets encore plus prononcés ont été observés dans une autre étude menée chez *X. laevis* où les BDE 47, 71 et 99 ont été utilisés (Balch et coll., 2006). Les BDE 71 et 47 entraînent un retard fort de la métamorphose à des doses respectivement de 60 µg et de 100 µg par têtard, une inhibition complète étant observée avec le BDE 71. En revanche, aucun effet n'a été observé avec le BDE 99, ce qui semble en contradiction avec l'étude précédente sans que cela ne soit expliqué. Chez *Rana pipiens*, d'autres auteurs ont également montré un effet de BDE 71 (7 à 277 ng/g de nourriture) : le climax de la métamorphose est retardé et la taille des animaux lors de la métamorphose est plus petite (Cary Coyle et Karasov, 2010). Chez *X. laevis*, le HBCD et le BDE 206 induisent également un effet de perturbation de l'effet inducteur des hormones thyroïdiennes sur la métamorphose à des doses de 100 à 1000 nM (Schriks et coll., 2006). Un effet similaire a été observé pour le TBBPA chez *Rana rugosa* à des concentrations de 10 nM à 1 µM et cet effet a été mis en relation avec une action d'inhibition du récepteur TRα humain (Kitamura et coll., 2005). Chez la grenouille *Pseudacris regilla*, des têtards exposés à 10 nM (5,4 µg/l) de TBBPA montrent au contraire un effet activateur sur des paramètres de la métamorphose : accroissement de la résorption de la queue, augmentation de l'expression de TRα, l'expression de TRβ n'étant pas modifiée (Veldhoen et coll., 2006). Les auteurs concluent que, à ces doses faibles, le TBBPA potentialise les effets de l'hormone thyroïdienne, ce qui est en contradiction avec les autres études similaires. Ainsi, chez des xénopes transgéniques rapporteurs pour les hormones thyroïdiennes (TH-bZIP-GFP), Fini et coll. (2007) observent effectivement que le TBBPA à 1 µM induit une perturbation de la

réponse aux hormones thyroïdiennes. L'observation inverse observée chez la grenouille *Pseudacris regilla* reste donc inexpliquée à ce jour et on ne sait pas si cet effet est lié à une spécificité d'espèce. Il faut cependant noter que dans un essai en culture organotypique de queues de *Rana catesbeiana* le TBBPA (10 à 1000 nM) n'a aucune activité de modification d'induction de TRβ, un marqueur précoce de la métamorphose (Hinther et coll., 2010).

Ces données permettent d'affirmer que les retardateurs de flammes bromés ont un effet sur l'axe thyroïdien. Cependant, les effets semblent variables selon l'espèce, le produit testé ou le mode d'exposition (par exemple, taux de T4 qui augmente ou diminue selon les cas), ce qui pose la question de savoir précisément à quel niveau de l'axe se produit cette interférence. Par ailleurs, il est pour l'instant impossible d'établir un lien entre les effets (développementaux, sur la reproduction) de ces molécules et ces anomalies de l'axe thyroïdien.

Effets développementaux et autres

Des tests de toxicité aiguë du TBBPA ont été menés. Liu et coll. (2007) montrent qu'à 0,14 mg/l, 50 % des embryons présentent des anomalies à 72 h de développement (heures post-fécondation). De même, Kuiper et coll. (2007a) rapportent que des zebrafish dont les parents et les embryons ont été traités à des doses de TBBPA allant jusqu'à 1,5 µM dans l'eau, présentent des anomalies morphologiques (malformations et œdème cardiaque). À des concentrations plus élevées, aucune éclosion n'est visible. Mc Cormick et coll. (2010) ont également observé une toxicité du TBBPA sur des embryons de zebrafish à 1,5 et 3 µM, doses auxquelles 100 % de mortalité est observée. Les embryons présentaient un œdème et des hémorragies associées à un ralentissement des battements cardiaques et des malformations de la queue. Les auteurs ont associé ces malformations à une surexpression de certaines métalloprotéases comme MMP-2, MMP-9 ou MMP-13. Une autre étude montre que des embryons de zebrafish traités à l'HBCD à 0,5 ou 1 mg/l présentent diverses malformations et une apoptose prononcée, associée à une diminution de l'expression de gènes anti-apoptotiques (*Mdm-2* et *Bcl-2*) et à une augmentation de l'activité des caspases 3 et 9 (Deng et coll., 2009). Chez le xénope, un effet tératogène du TBBPA a été mis en évidence à une dose de 1 mg/l : anomalies des yeux avec souvent absence de la rétine, de la pigmentation, canal anal élargi, œdème péricardique, nageoires étroites (Shi et coll., 2010).

Des données sur les effets développementaux ont également été obtenues avec le BDE 47 (Lema et coll., 2007). Des embryons exposés à des doses de 500 à 5 000 µg/l montrent un délai d'éclosion, une courbure anormale du corps, une croissance ralentie, une arythmie cardiaque et des défauts de formation du système nerveux. Une étude similaire portant sur 4 PBDE

différents (BDE 47, 99, 153 et 209) montre également un effet développemental de ces molécules (Wahl et coll., 2010).

Deux études récentes rapportent des effets non liés aux études précédentes. La première s'intéressait au BDE 47 sur le zebrafish (Chou et coll., 2010). Le composé a été administré via la nourriture depuis la période juvénile (21 jours après la naissance) jusqu'au jour 90. Des doses de 2,7 à 409 ng/g de tissus humides ont été mesurées chez les poissons traités et aucun effet sur la fertilité, la taille des animaux ou leur taux de survie n'a été observé. L'histologie des gonades était normale. En revanche, ces auteurs ont noté un effet sur les paramètres de nage de poisson suivie par un système de vidéo : le temps d'activité des poissons et la distance parcourue par chaque animal sont inversement corrélés à la quantité de BDE 47 retrouvée dans les tissus ce qui suggère une atteinte comportementale.

La seconde étude a utilisé le saumon Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) et a nourri des adultes avec une nourriture contenant un mélange de 5 PBDE (47, 99, 100, 153 et 154) (Arkoosh et coll., 2010). Deux concentrations différentes de PBDE différant par un facteur 10 ont été utilisées et des sommes totales de 270 à 1 400 ng/g de poids sec ont été retrouvées dans l'estomac des poissons traités. Les animaux ont été soumis à un test d'infection par la bactérie pathogène *Listonella anguillarum* et les animaux traités à la dose faible ont montré une plus grande susceptibilité à l'infection que les témoins. Curieusement, cet effet n'a pas été retrouvé aux plus hautes doses.

Bien que préliminaires, ces deux études suggèrent donc que la gamme des effets des retardateurs de flammes bromés, et notamment des PBDE, est plus vaste que ce que l'on pensait et cela justifie donc une surveillance accrue de ces molécules.

Études transcriptomiques et protéomiques

Des études globales, transcriptomiques ou protéomiques, ont été menées avec des retardateurs de flamme sur des modèles poissons.

Une de ces études a utilisé une approche transcriptomique pour étudier les effets d'un métabolite du BDE 47 sur le zebrafish sachant que ce composé, le 6-OH-BDE 47, est hautement toxique chez le zebrafish puisqu'il induit la mort par suffocation à des concentrations nanomolaires (van Boxtel et coll., 2008). Par une approche transcriptomique sur des fibroblastes embryonnaires de zebrafish, il a été montré que ce composé altère l'expression de gènes impliqués dans le transport des protons et le métabolisme des carbohydrates. Des études fonctionnelles ont montré en effet que ce composé bloque les phosphorylations oxydatives dans des mitochondries de zebrafish. Cette étude indique que certains types de PBDE peuvent avoir des effets très spécifiques et

qu'il est donc difficile de généraliser les effets et les modes d'action à l'échelle de l'ensemble des congénères.

Une approche transcriptomique a également été utilisée pour caractériser les effets d'un mélange « naturel » extrait de foies de poissons de rivière norvégiens (*Lota lota*) qui contenait des retardateurs de flamme (PBDE), des PCB et du DDT (Lyche et coll., 2010). Les zebrafish exposés à ce mélange ajouté dans leur nourriture présentaient une puberté précoce, un excès de mâles et une différence de poids par rapport aux témoins. Au niveau hépatique, ces poissons montrent un changement dans l'expression de gènes impliqués dans les réponses hormonales et la croissance. Ainsi, l'expression du coactivateur des récepteurs nucléaires NCoA3 est augmentée dans ces poissons. Il est bien impossible à ce stade de relier ces effets à l'une des molécules particulières présentes dans le mélange.

Des approches de protéomique ont été également conduites en utilisant là encore le zebrafish. Une première étude s'est focalisée sur le HBCD et le TBBPA, seuls ou en mélange. Une analyse par protéomique de cellules hépatiques de ces poissons montre que les deux molécules induisent des signatures distinctes avec cependant un certain chevauchement dans la réponse (Kling et Förlin, 2009). Le HBCD montre particulièrement un effet sur des gènes impliqués dans le métabolisme des protéines alors que le TBBPA semble cibler des gènes intervenant dans la conformation des protéines et dans la production de NADPH. La partie commune de la réponse concerne des gènes intervenant dans la gluconéogenèse ce qui semble indiquer un rôle métabolique. Des effets au niveau du cycle cellulaire sont également observés. Une autre étude menée sur des zebrafish adultes traités au TBBPA à 0,75 µM ou 1,5 µM pendant 14 jours a couplé des approches de transcriptomique et de protéomique (De Wit et coll., 2008). Ce travail montre une interférence du TBBPA avec les voies de réponses des hormones thyroïdiennes et de la vitamine A, ce qui, au moins pour les hormones thyroïdiennes est cohérent avec les études rapportées ci-dessus. Une réponse au niveau des mécanismes de stress oxydatif et du métabolisme des glucides est également observée.

En conclusion, les retardateurs de flammes semblent avoir un effet relativement mineur au niveau reprotoxique chez les vertébrés aquatiques. En revanche, les différentes molécules, et en particulier le TBBPA et certains PBDE, ont un effet développemental marqué et produisent diverses anomalies morphologiques chez les embryons traités. Le mécanisme d'action le plus convaincant observé à ce jour chez les poissons semble cibler la voie des hormones thyroïdiennes. Les quelques approches « omiques » vont dans le même sens tout en indiquant également un effet au niveau du métabolisme, notamment sur le foie. Toute généralisation apparaît impossible car il est probable que les différentes molécules (TBBPA, PBDE, HBCD) ont des effets, des mécanismes d'action et des cibles différents.

Bibliographie

ARKOOSH MR, BOYLEN D, DIETRICH J, ANULACION BF, GINAYLITALO, et coll. Disease susceptibility of salmon exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Aquat Toxicol* 2010, **98** : 51-59

BALCH G, METCALFE C. Developmental effects in Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products. *Chemosphere* 2006, **62** : 1214-1223

CARLSSON G, KULKARNI P, LARSSON P, NORRGREN L. Distribution of BDE-99 and effects on metamorphosis of BDE-99 and -47 after oral exposure in Xenopus tropicalis. *Aquat Toxicol* 2007, **84** : 71-79

CARY COYLE TL, KARASOV WH. Chronic, dietary polybrominated diphenyl ether exposure affects survival, growth, and development of Rana pipiens tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 2010, **29** : 133-141

CHOU CT, HSIAO YC, KO FC, CHENG JO, CHENG YM, CHEN TH. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (Danio rerio). *Aquat Toxicol* 2010, **98** : 388-395

DENG J, YU L, LIU C, YU K, SHI X, coll. Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 2009, **93** : 29-36

DE WIT M, KEIL D, REMMERIE N, VAN DER VEN K, VAN DEN BRANDHOF EJ, coll. Molecular targets of TBBPA in zebrafish analysed through integration of genomic and proteomic approaches. *Chemosphere* 2008, **74** : 96-105

HINTHER A, DOMANSKI D, VAWDA S, HELBING CC. C-fin : a cultured frog tadpole tail fin biopsy approach for detection of thyroid hormone-disrupting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 2010, **29** : 380-388

FINI JB, LE MEVEL S, TURQUE N, PALMIER K, ZALKO D, coll. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 5908-5014

KITAMURA S, KATO T, IIDA M, JINNO N, SUZUKI T, coll. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds : Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* 2005, **76** : 1589-1601

KLING P, FÖRLIN L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, **72** : 1985-1993

KUIPER RV, VAN DEN BRANDHOF EJ, LEONARDS PE, VAN DER VEN LT, WESTER PW, VOS JG. Toxicity of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in zebrafish (Danio rerio) in a partial life-cycle test. *Arch Toxicol* 2007a, **81** : 1-9

KUIPER RV, CANTÓN RF, LEONARDS PE, JENSSEN BM, DUBBELDAM M, coll. Long-term exposure of European flounder (Platichthys flesus) to the flame-retardants tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD). *Ecotoxicol Environ Saf* 2007b, **67** : 349-60

KUIPER RV, VETHAAK AD, CANTÓN RF, ANSELMO H, DUBBELDAM M, coll. Toxicity of analytically cleaned pentabromodiphenylether after prolonged exposure in estuarine

European flounder (Platichthys flesus), and partial life-cycle exposure in fresh water zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere* 2008, **73** : 195-202

LEMA SC, SCHULTZ IR, SCHOLZ NL, INCARDONA JP, SWANSON P. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat Toxicol* 2007, **82** : 296-307

LEMA SC, DICKEY JT, SCHULTZ IR, SWANSON P. Dietary exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1694-1649

LIU HL, LIU XH, WANG XY, WANG XR, YU HX. Toxicity of BPA and TBBPA to Daphnia magna and zebrafish Brachydanio rerio. *Huan Jing Ke Xue* 2007, **28** : 1784-1787

LYCHE JL, NOURIZADEH-LILLABADI R, ALMAAS C, STAVIK B, BERG V, coll. Natural mixtures of persistent organic pollutants (POP) increase weight gain, advance puberty, and induce changes in gene expression associated with steroid hormones and obesity in female zebrafish. *J Toxicol Environ Health A* 2010, **73** : 1032-1057

MCCORMICK JM, PAIVA MS, HÄGGBLOM MM, COOPER KR, WHITE LA. Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (Danio rerio) development and matrix metalloproteinase expression. *Aquat Toxicol* 2010, **100** : 255-262

MUIRHEAD EK, SKILLMAN AD, HOOK SE, SCHULTZ IR. Oral exposure of PBDE-47 in fish : toxicokinetics and reproductive effects in Japanese Medaka (Oryzias latipes) and fathead minnows (Pimephales promelas). *Environ Sci Technol* 2006, **40** : 523-528

SCHRIKS M, ZVINAVASHE E, FURLOW JD, MURK AJ. Disruption of thyroid hormone-mediated Xenopus laevis tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona brominated diphenyl ether (BDE206). *Chemosphere* 2006, **65** : 1904-1908

SHI H, QIAN L, GUO S, ZHANG X, LIU J, CAO Q. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on Xenopus tropicalis embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010, **152** : 62-68

VAN BOXTEL AL, KAMSTRA JH, CENIJN PH, PIETERSE B, WAGNER JM, coll. Microarray analysis reveals a mechanism of phenolic polybrominated diphenylether toxicity in zebrafish. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 1773-1779

VELDHOEN N, BOGGS A, WALZAK K, HELBING CC. Exposure to tetrabromobisphenol-A alters TH-associated gene expression and tadpole metamorphosis in the Pacific tree frog Pseudacris regilla. *Aquat Toxicol* 2006, **78** : 292-302

WAHL M, GUENTHER R, YANG L, BERGMAN A, STRAEHLE U, coll. Polybrominated diphenyl ethers and arylhydrocarbon receptor agonists : Different toxicity and target gene expression. *Toxicol Lett* 2010, **198** : 119-126

YU L, DENG J, SHI X, LIU C, YU K, ZHOU B. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae. *Aquat Toxicol* 2010, **97** : 226-233. Erratum in: *Aquat Toxicol* 2010, **100** : 376

48
Mécanismes d'action

Les cibles des retardateurs de flamme bromés (RFB) au niveau des récepteurs nucléaires ne sont pas encore complètement identifiées. Les études *in vitro* les plus pertinentes ont été réalisées dans le cadre du programme européen FIRE[22] et essentiellement publiées par l'équipe de T. Hamers (Hamers et coll., 2006).

Récepteurs nucléaires

Hamers et coll. (2006) ont étudié 27 RFB pour leurs effets sur les récepteurs des œstrogènes alpha (ERα), des androgènes (AR), de la progestérone (PR), des hormones thyroïdiennes alpha (TRα) et de la dioxine (AhR) ainsi que sur l'enzyme en charge de la sulfatation de l'œstradiol (œstradiol sulfotransférase : E2SULT) et la protéine de transport de l'hormone thyroïdienne (transthyrétrine). Parmi les différentes molécules étudiées, le BDE 19 s'est avéré être une molécule à activité œstrogénique agoniste et le 6-hydroxyl BDE 47 un anti-œstrogène. Cette étude a également montré que le BDE 19 et le BDE 100 avaient une activité anti-androgénique (Hamers et coll., 2006 ; Harju et coll., 2007).

D'autres RFB comme le BDE 28, BDE 47, BDE 100 et surtout le 4OH-BDE 17 sont œstrogéniques (Kojima et coll., 2009) de même que le 4OH-BDE 49 et le BDE 17 (Mercado-Feliciano et coll., 2008). Ces résultats ont été confirmés pour le BDE 100 (Stoker et coll., 2005 ; Kojima et coll., 2009). Le 4OH-BDE 17 (Kojima et coll., 2009) et le BDE 47 (Stoker et coll., 2005) ont également une activité anti-androgénique.

Parmi les différents RFB testés, seul le 1,2-dibromoéthyl cyclohexane (BCH) s'est avéré être un androgène à activité agoniste (Larsson et coll., 2006 ; Khalaf et coll., 2009).

D'après les travaux de Hamers et coll. (2006), le BDE 38 et le BDE 153 ont des effets agonistes pour le récepteur AhR alors que le BDE 47 et l'octa-BDE sont antagonistes.

---

22. Le projet FIRE (19 participants de 7 pays), un des 4 projets de Credo (*Cluster of Research on Endocrine Disruption in Europe*), a pour objet une évaluation des risques présentés par les polybromés.

Selon des études récentes, le BDE 47, 99, 209, le penta-BDE et le HBCD sont des ligands activateurs du récepteur PXR (Pacyniak et coll., 2007 ; Fery et coll., 2009). D'autre part, le TBBPA et le TCBPA sont des ligands agonistes de PPARγ (Patrick Balaguer, communication personnelle).

Enfin, plusieurs effets ont été observés sur la modulation de l'activité de TRα. Le TBBPA et le TCBPA sont des antagonistes de TRα (Sun et coll., 2009 ; Patrick Balaguer, communication personnelle), le TBBPA et le 2,4,6-TBP sont capables de se lier à TR.

De même, l'activité E2-sulfotransférase est inhibée par le TBBPA, le PCP, le 6OH-BDE 47 et dans une moindre mesure par le BDE 47 (Hamers et coll., 2006).

Le tableau 48.I rassemble les résultats des différentes études.

Tableau 48.I : Activité des principaux PBDE, TBBPA, HBCD

Récepteur nucléaire	Activité	Polybromés
ER	Agoniste	BDE 17, 4OH-BDE 17, BDE 19, BDE 28, BDE 47, 4OH-BDE 49, BDE 100, BDE 38 BDE 49, BDE 79, BDE 155
ER	Antagoniste	6OH-BDE 47, BDE 181, BDE 183, BDE 185, BDE 190
AR	Agoniste	BCH
AR	Antagoniste	BDE 19, BDE 100, 4OH-BDE 17 BDE 47, BDE 17, BDE 66, BDE 85 BDE 154
AhR	Agoniste	BDE 38, BDE 153
AhR	Antagoniste	BDE 47, Octa-BDE
PXR	Agoniste	BDE 47, BDE 99, BDE 209, Penta-BDE HBCD
PPARg	Agoniste	TBBPA, TCBPA
TR	Antagoniste	TBBPA, TCBPA

Finalement, des effets des RFB sur la stéroïdogenèse et plus particulièrement sur l'activité aromatase ont également été décrits. Ainsi, Canton et coll. (2008) ont montré que plusieurs RFB inhibaient l'activité de cette enzyme à des concentrations comprises entre 1 et 10 mM. Ces effets ont été confirmés par les travaux de He et coll. (2008) dans la lignée cellulaire H295R.

Effets sur la voie de signalisation AhR ?

Parce qu'il existe une parenté chimique entre des retardateurs de flammes et des ligands du récepteur de la dioxine, AhR, plusieurs études ont suggéré en effet que AhR pourrait être une cible de ces molécules. Ainsi, certains auteurs

ont observé après exposition à différents PBDE une altération des niveaux d'expression de CYP1A1, une enzyme hépatique qui est régulée par AhR dans le foie. C'est le cas de Raldua et coll. (2008) sur des barbeaux du bassin de l'Ebre exposés dans leur milieu de vie à des mélanges de PBDE pour lesquels ces auteurs notent une diminution de l'expression de CYP1A1 et des altérations histologiques dans le foie. De même, Ronisz et coll. (2004) montrent une diminution de CYP1A1 après traitement de truites arc en ciel juvéniles avec du TBBPA (effet à partir de 10 mg/kg en intrapéritonéal) et du HBCD à forte dose (500 mg/kg). Une augmentation concomitante de la taille du foie a été observée. Des anomalies dans l'expression d'enzymes ou de molécules liées au stress oxydatif (SOD, HSP70) dans le foie ont également été observées avec le TBBPA mais pas avec le HBCD sur des zebrafish traités à 0,75 mg/l dans l'eau (Hu et coll., 2009). Il a été montré en outre que des mélanges de retardateurs de flamme (Firemaster 550 et BZ-54) pouvaient induire des dommages sur l'ADN extrait du foie de vairons traités oralement par ces composés (Bearr et coll., 2010). En revanche, Chen et coll. (2010) observent une augmentation légère de l'activité CYP1A1 après traitement de zebrafish juvéniles au BDE 47 (de 20 à 60 jours post-éclosion ; 68,8 ng/g dans les poissons traités).

Des résultats similaires sont retrouvés dans une autre étude où le BDE 47 à 10 µM induit une induction de l'expression de CYP1A1 chez le zebrafish et une activation de AhR dans un test de transactivation dans des cellules de mammifères (Wahl et coll., 2008). Les mêmes auteurs attribuent cependant ces effets non pas au PBDE 47 mais à du TBDF (2,3,7,8-tétrabromodibenzodioxin) contaminant la préparation de BDE 47. La même conclusion a été obtenue par Kuiper et coll. (2006) sur du DE-71 qui induit l'expression de CYP1A1 et une activation transcriptionelle de AhR : là encore, l'effet a été relié à une impureté contaminant la préparation industrielle de DE-71. Il faut donc se méfier des conclusions hâtives obtenues avec des préparations de faible grade de pureté.

Ces doutes sur un effet direct des PBDE sur la voie AhR ont été renforcés par une étude où les effets activateurs sur le récepteur AhR ont été couplés à une analyse transcriptomique (Wahl et coll., 2010). Ce travail montre en effet clairement que le BDE 47, 99, 153 ou 209 n'activent pas mais inhibent plutôt la voie de signalisation AhR. Des études de *microarrays* menées sur des cellules de rat suggèrent en outre que la signature transcriptionnelle induite par les PBDE dans le foie est bien distincte de celle de ligands classiques de AhR. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la voie AhR n'est pas, contrairement à ce que l'on pensait au départ, une cible pertinente pour les retardateurs de flammes.

Modèles QSAR

La disponibilité de données fiables concernant l'affinité des PBDE avec le récepteur aryle hydrocarboné (AhR) (Chen et coll., 2001) a favorisé le développement de modèles QSAR fiables (Zheng et coll., 2005 ; Wang et coll., 2005 et 2006 ; Xu et coll., 2007 ; Wu et coll., 2009 ; Gu et coll., 2010). Néanmoins, on retrouve en littérature quelques études spécifiques aux relations structure/propriétés reliées à l'activité de perturbateur endocrinien des PBDE (Meerts et coll., 2001 ; Liu et coll., 2007 ; Kojima et coll., 2009 ; Yang et coll., 2009). Le « *endpoint* » communément utilisé est l'activité envers le récepteur des androgènes (AR) ou des œstrogènes (ER). Cette activité est évaluée en termes de dose-réponse avec le test AR- et ER-CALUX (Hamers et coll., 2006), qui fait appel à une lignée de cellules humaines présentant des récepteurs des androgènes ou des œstrogènes modifiés à l'aide d'un gène rapporteur luminescent. L'intensité de l'émission de lumière est proportionnelle à la quantité de substance liée au récepteur et permet de définir le logarithme de la moitié de la concentration maximale inhibitrice ($\log CI_{50}$). Ce logarithme est l'*endpoint* final normalement considéré dans les études QSAR.

Grâce à ces tests, une réponse ER-agoniste a été mise en évidence pour plusieurs BDE ainsi que pour un mélange de octa-BDE (tableau 48.I et Hamers et coll., 2006). Ces résultats suggèrent d'une part, que l'activité œstrogénique est associée à une faible bromation des PBDE et, d'autre part, que l'activité anti-œstrogénique est déterminée par un degré élevé de bromation (Meerts et coll., 2001). En termes de structure, les molécules substituées aux positions [2,2',6] ou [2,2',4] (figure 48.1) ont une activité ER-agoniste. Le BDE 30, substitué en positions 3, 4 et 5, représente une exception. Les mêmes caractéristiques sont observées pour les AR-antagonistes.

Un modèle QSAR a ensuite été déterminé pour l'AR-antagonisme, en utilisant ces résultats AR-CALUX comme *endpoints*. Ce modèle a une bonne corrélation avec l'expérience (r^2=0,90) (Harju et coll., 2007) et prévoit une activité AR-antagoniste pour les BDE 17, BDE 66, BDE 85, et BDE 154, des penta-BDE non testés dans l'étude précédente.

Plus généralement, ce modèle QSAR lie l'activité AR-antagoniste à un bas degré de bromation et aux substitutions en ortho- (positions 2, 2', 6 et 6') ou ortho- et para- (positions 4 et 4'). À noter que les PBDE ne peuvent pas former des liaisons hydrogène comme d'autres perturbateurs endocriniens (le BPA, par exemple) (Harju et coll., 2007).

Un travail plus récent sur 8 PBDE et 8 dérivés hydroxylés a confirmé ces résultats (Kojima et coll., 2009). De plus, il a été suggéré qu'un groupe hydroxylique en position para- (positions 4 et 4') augmente l'activité œstrogénique, qui peut également être modulée (réduite) par des atomes de brome dans les positions proches de la position para- (3, 3', 5 et 5'). Ce dernier effet a également été remarqué pour le BPA (Liu et coll., 2007).

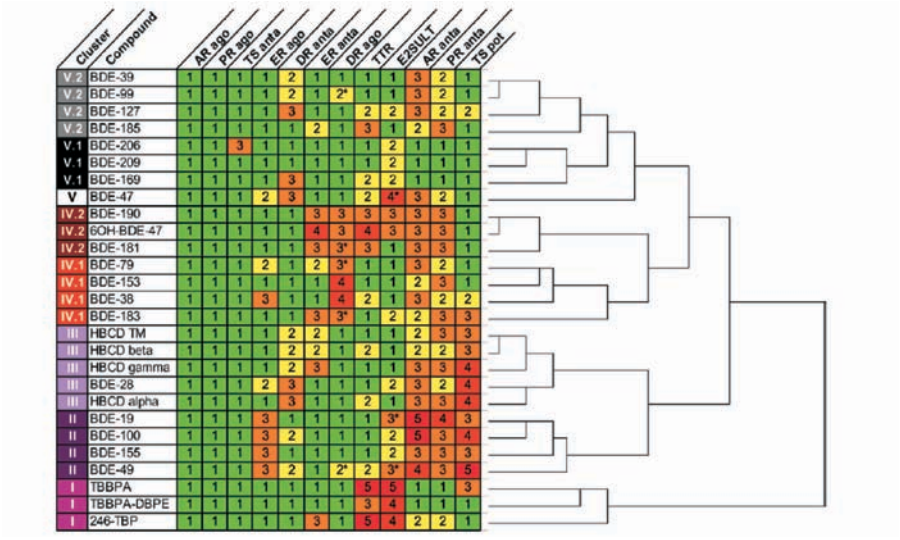


Figure 48.1 : Classification hiérarchique des profils de toxicité de 27 retardateurs de flamme bromés (d'après Hamers et coll., 2006)

Les profils de toxicité permettent de définir 5 groupes (clusters) différents. La gradation d'activité des composés est indiquée par les couleurs de vert (activité faible) à rouge (activité forte).

ago : agoniste ; anta : antagoniste ; AR : récepteur des androgènes ; DR : récepteur de la dioxine ; E2SULT : œstradiol sulfotransférase ; ER : récepteur des œstrogènes ; pot : potentialisation ; PR : récepteur de la progestérone ; TS : T-screen (test fonctionnel T3-dépendant de la prolifération de cellule tumorale hypophysaire de rat) ; TTR : protéine de transport de la transthyrétine

Des informations plus détaillées sur les interactions ligand/récepteur ont été obtenues ces dernières années, grâce à des modèles 3D-QSAR (type CoMSIA) (Yang et coll., 2009). Ces analyses ont mis en évidence que le champ électrostatique représente la plus grande contribution à l'activité anti-androgénique de PBDE, avec un poids de 61 % dans le modèle QSAR. De plus, une analyse des résultats théoriques met en évidence une réduction de l'activité anti-androgène (accumulation de charges positives) due aux substituants bromés en position para-, en accord avec l'expérience. Par exemple, le 2,2',4,4',6-penta-BDE (BDE 100, CI_{50}=0,097 µM) a une activité plus basse que le 2,2',6-tri-BDE 19 (CI_{50}=0,060 µM). Les oxygènes carboxyliques des acides aminés Leu701 et Asn705 peuvent être impliqués dans l'interaction avec le ligand PBDE (figure 48.2).

Une autre région positive est localisée autour de la position 3 et 5 et, en effet, le 3,3',4,5,5'-penta-BDE (BDE 27) a une activité plus faible que le 3,3',4,5'-tetra-BDE (BDE 79, CI_{50}=5,1 et 2,0 µM respectivement). Dans ce cas, les atomes d'oxygène (négatifs) des résidus Val746, Phe764 et Gln711 peuvent être impliqués dans l'interaction ligand/substrat.

En revanche, deux régions favorisant les charges négatives sont présentes dans le centre de poche, donc la substitution en ortho- est favorable pour l'antagonisme-AR, tandis que celles en méta- et para- sont défavorisées.

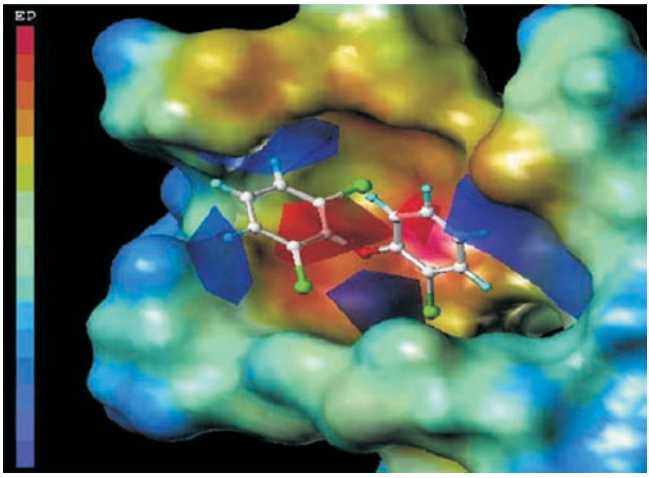


Figure 48.2 : Structure du BDE 19 dans le site actif de l'AR, représenté par son potentiel électrostatique (bleu : négatif ; rouge : positif ; d'après Yang et coll., 2009)

La contribution hydrophobique est un autre facteur important dans l'activité AR-antagoniste des PBDE et représente 26 % de la variation en activité dans la série de PBDE. En effet, la présence des groupes hydrophobes en position ortho- provoque une augmentation de l'activité anti-androgénique. En croisant les informations théoriques du champ électrique et du champ hydrophobe, il a été suggéré que la présence d'un groupe électro-attracteur avec des propriétés hydrophobes en position ortho- maximise l'activité AR-antagoniste. Cette hypothèse est en accord avec l'ordre expérimental d'activité : 2,2',4,4',6-penta-BDE (CI_{50}=0,097 µM) > 2,20,4,40-tétra-BDE (CI_{50}=1,0 µM) > 2,4,40-tri-BDE (CI_{50}=3,1 µM) (Hamers et coll., 2006). L'effet hydrophobe peut être lié à des interactions avec les résidus Leu707, Leu704, Met742 et Met745.

Deux autres articles récents (Papa et coll., 2010 ; Yang et coll., 2010) ont pris en considération non seulement les PBDE, mais également d'autres retardateurs de flamme, comme le HBCD et le TBBPA. Yang et coll. (2010) proposent des modèles 3D-QSAR (ComSIA) corrects, avec de bons pouvoirs prédictifs (q2>0,8) et relativement bien corrélés aux données expérimentales (R^2>0,9, voir figure 48.3). Ces modèles ont été obtenus à partir de 26 RFB, dont 17 PBDE. Aucune vérification sur l'ensemble extérieur à celui de préparation du modèle n'a été effectuée.

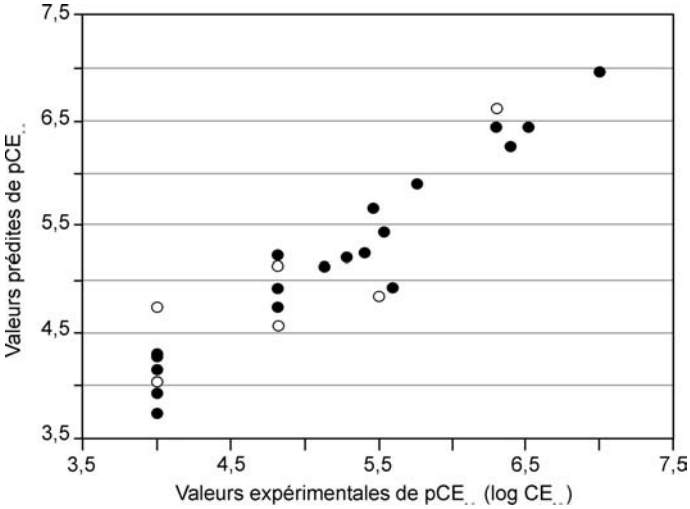


Figure 48.3 : Corrélation entre les activités œstrogéniques expérimentales et prédites des PBDE, des PBDE para-hydroxylés et des dérives bromés du BPA (d'après Yang et coll., 2010)

Les cercles noirs représentent les molécules dans le jeu d'entraînement (20 molécules dont 13 PBDE) et les cercles blancs celles dans le jeu de validation (6 molécules dont 4 PBDE)

Dans l'article de Papa et coll. (2010), plusieurs modèles QSAR, caractérisés par une bonne précision et un bon pouvoir prédictif interne et externe (Qext entre 0,8 et 0,9), ont été proposés pour le BDE 209 et 34. Les modèles pour l'activité ER-agoniste suggèrent qu'aucun composé des familles considérées ne présente une activité élevée. En revanche, des activités modérées (100 nM<EC50<1 000 nM) ont été associées aux substitutions en ortho- de PBDE, en l'absence de bromes en position para-4,4'. Les BDE 100 et BDE 155, avec, respectivement des bromes en positions 2,2',6 et 2,2',6 et 6', présentant une activité modérée, représentent une exception. Ainsi, tous les PBDE avec des bromes en position 3,3',4 et 2' ont une activité œstrogénique faible (EC50>1 000 nM). Enfin, les modèles proposés prévoient aussi des activités ER-agonistes significatives pour les mono-, tri-, et penta-bromophénols, l'hexabromobenzène, le HBCD et les mono-, di- et tri-bromobisphénol A.

Modèles *in silico*

Aucune étude détaillée sur l'interaction PBDE-récepteur n'a été recensée dans la littérature examinée. En revanche, les propriétés chimico-physiques (structure moléculaire, affinité électronique...) des PBDE ont fait l'objet de

deux études atomistiques qui ont montré qu'elles peuvent être prévues par des méthodes propres à la chimie quantique (Hu et coll., 2005 ; Zhao et coll., 2008).

En conclusion, l'équipe de T. Hamers a étudié 27 composés polybromés pour leurs effets sur les récepteurs des œstrogènes alpha (ERα), des androgènes (AR), de la progestérone (PR), des hormones thyroïdiennes alpha (TRα) et de la dioxine (AhR) ainsi que sur l'enzyme en charge de la sulfatation de l'œstradiol et la protéine de transport de l'hormone thyroïdienne (transthyrétrine) sans montrer un effet de classe mais plutôt des effets variables selon les composés. Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré que AhR pourrait être une cible de ces molécules, mais des études plus récentes montrent que la voie AhR n'est pas une cible pertinente pour les retardateurs de flamme.

Les études transcriptomiques ou protéomiques qui ont été menées avec des retardateurs de flamme sur des modèles poissons confirment qu'il est difficile de généraliser les effets et les modes d'action à l'échelle de l'ensemble des congénères de PBDE.

Les résultats de plusieurs travaux de criblage *in vitro* suggèrent que l'activité œstrogénique est associée à une faible bromation des PBDE alors que l'activité anti-œstrogénique est déterminée par un degré élevé de bromation. Les molécules substituées aux positions [2,2',6] ou [2,2',4]) ont une activité ER-agoniste. De même, le modèle QSAR lie l'activité AR-antagoniste à un bas degré de bromation et aux substitutions en ortho- (positions 2, 2', 6 et 6') ou ortho- et para- (positions 4 et 4'). Un groupe hydroxylique en position para- (positions 4 et 4') augmente l'activité œstrogénique. La réduction de l'activité anti-androgène (accumulation de charges positives) est due aux substituants bromés en position para. En revanche, la présence des groupes hydrophobes en position ortho- provoque une augmentation de l'activité anti-androgénique. En croisant les informations théoriques du champ électrique et du champ hydrophobe, il a été suggéré que la présence d'un groupe électro-attracteur avec des propriétés hydrophobes en position ortho- maximise l'activité AR-antagoniste.

Bibliographie

BEARR JS, STAPLETON HM, MITCHELMORE CL. Accumulation and DNA damage in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to 2 brominated flame-retardant mixtures, Firemaster 550 and Firemaster BZ-54. *Environ Toxicol Chem* 2010, **29** : 722-729

CANTÓN RF, SCHOLTEN DE, MARSH G, DE JONG PC, VAN DEN BERG M. Inhibition of human placental aromatase activity by hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs). *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **227** : 68-75

CHEN GS, KONSTANTINOV AD, CHITTIM BG, JOYCE EM, BOLS NC, BUNCE NJ. Synthesis of polybrominated diphenyl and their capacity to induce CYPA1 by the Ah receptor mediated pathway. *Environ Science Technology* 2001, **35** : 3749-3756

CHEN TH, CHENG YM, CHENG JO, CHOU CT, HSIAO YC, KO FC. Growth and transcriptional effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicol Environ Saf* 2010, **73** : 377-383

FERY Y, BUSCHAUER I, SALZIG C, LANG P, SCHRENK D. Technical pentabromodiphenyl ether and hexabromocyclododecane as activators of the pregnane-X-receptor (PXR). *Toxicology* 2009, **264** : 45-51

GU C, JU X, JIANG X, YU K, YANG S, SUN C. Improved 3D-QSAR analyzes for the predictive toxicology of polybrominated diphenyl ethers with CoMFA/CoMSIA and DFT. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010, **73** : 1470-1479

HAMERS T, KAMSTRA JH, SONNEVELD E, MURK AJ, KESTER MH, coll. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci* 2006, **92** : 157-173

HARJU M, HAMERS T, KAMSTRA JH, SONNEVELD E, BOON JP, coll. Quantitative structure-activity relationship modeling on in vitro endocrine effects and metabolic stability involving 26 selected brominated flame retardants. *Environ Toxicol Chem* 2007, **26** : 816-826

HARJU M, HAMERS T, KAMSTRA JH, SONNEVELD E, BOON JP, coll. Quantitative structure-activity relationship modeling on in vitro endocrine effects and metabolic stability involving 26 selected brominated flame retardants. *Environ Toxicol Chem* 2007, **26** : 816-826

HE Y, MURPHY MB, YU RM, LAM MH, HECKER M, coll. Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. *Toxicol Lett* 2008, **176** : 230-238

HU J, ERIKSSON L, BERGMAN A, JAKOBSSON E, KOLEHMAINEN E, coll. Molecular orbital studies on brominated diphenyl ethers. Part II-·reactivity and quantitative structure-activity (property) relationships. *Chemosphere* 2005, **59** : 1043-1057

HU J, LIANG Y, CHEN M, WANG X. Assessing the toxicity of TBBPA and HBCD by zebrafish embryo toxicity assay and biomarker analysis. *Environ Toxicol* 2009, **24** : 334-342

KHALAF H, LARSSON A, BERG H, MCCRINDLE R, ARSENAULT G, OLSSON PE. Diastereomers of the Brominated Flame Retardant 1,2-Dibromo-4-(1,2 dibromo ethyl)cyclohexane Induce Androgen Receptor Activation in the HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell Line and the LNCaP Prostate Cancer Cell Line. *Env Health Perspect* 2009, **117** : 1853-1859

KOJIMA H, TAKEUCHI S, URAMARU N, SUGIHARA S, YOSHIDA T, KITAMURA S. Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1210-1218

KUIPER RV, MURK AJ, LEONARDS PE, GRINWIS GC, VAN DEN BERG M, VOS JG. In vivo and in vitro Ah-receptor activation by commercial and fractionated pentabromodiphenylether using zebrafish (Danio rerio) and the DR-CALUX assay. *Aquat Toxicol* 2006, **79** : 366-875

LARSSON A, ERIKSSON LA, ANDERSSON PL, IVARSON P, OLSSON PE. Identification of the brominated flame retardant 1,2-dibromo-4-(1,2-dibromoethyl)cyclohexane as an androgen agonist. *J Med Chem* 2006, **49** : 7366-7372

LIU H, PAPA E, WALKER JD, GRAMATICA P. In silico screening of estrogen-like chemicals based on different nonlinear classification models. *J Mol Grap Mod* 2007, **26** : 135-144

MEERTS I, LETCHER RJ, HOVING S, MARSH G, BERGMAN A, coll. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* 2001, **109** : 399-407

MERCADO-FELICIANO M, BIGSBY RM. Hydroxylated metabolites of the polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 are weak estrogen receptor-alpha ligands. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1315-1321

PACYNIAK EK, CHENG X, CUNNINGHAM ML, CROFTON K, KLAASSEN CD, GUO GL. The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators. *Toxicol Sci* 2007, **97** : 94-102

PAPA E, KOVARICH S, GRAMATICA P. QSAR modeling and prediction of the endocrine-disrupting potencies of brominated flame retardants. *Chem Res Toxicol* 2010, **23** : 946-954

RALDÚA D, PADRÓS F, SOLÉ M, ELJARRAT E, BARCELÓ D, RIVA MC, BARATA C. First evidence of polybrominated diphenyl ether (flame retardants) effects in feral barbel from the Ebro River basin (NE, Spain). *Chemosphere* 2008, **73** : 56-64

RONISZ D, FINNE EF, KARLSSON H, FÖRLIN L. Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquat Toxicol* 2004, **69** : 229-245

STOKER TE, COOPER RL, LAMBRIGHT CS, WILSON VS, FURR J, GRAY LE. In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, **207** : 78-88

WAHL M, LAHNI B, GUENTHER R, KUCH B, YANG L, coll. A technical mixture of 2,2',4,4'-tetrabromo diphenyl ether (BDE47) and brominated furans triggers aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated gene expression and toxicity. *Chemosphere* 2008, **73** : 209-215

WANG Y, LIU H, ZHAO C, LIU H, CAI Z, coll. Quantitative structure-activity relationship models for prediction of the toxicity of polybrominated diphenyl ether congeners. *Environ Science Technol* 2005, **39** : 4961-4966

WANG Y, ZHAO C, MA W, LIU H, WANG T, JIANG G. Quantitative structure-activity relationship for prediction of the toxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners. *Chemosphere* 2006, **64** : 515-524

WU B, ZHANG Y, KONG J, ZHANG X, CHENG S. In silico predication of nuclear hormone receptors for organic pollutants by homology modeling and molecular docking. *Toxicology Letters* 2009, **191** : 69-73

XU HY, ZOU JIW, YU QS, WANG YH, ZHANG JY, JIN HX. QSPR/QSAR models for prediction of the physicochemical properties and biological activity of polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere* 2007, **66** : 1998-2010

YANG W, MU Y, GIESY JP, ZHANG A, YU H. Anti-androgen activity of polybrominated diphenyl ethers determined by comparative molecular similarity indices and molecular docking. *Chemosphere* 2009, **75** : 1159-1164

YANG W, LIU X, LIU H, WU Y, GIESY JP, YU H. Molecular docking and comparative molecular similarity indices analysis of estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers and their analogues. *Environ Toxicol Chem* 2010, **29** : 660-668

ZHAO Y, TAO F, ZENG E. Theoretical study on the chemical properties of polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere* 2008, **70** : 901-907

ZHENG G, XIAO M, LU X. QSAR study on the Ah receptor-binding affinities of polyhalogenated dibenzo- p -dioxins using net atomic-charge descriptors and a radial basis neural network. *Anal Bioanal Chem* 2005, **383** : 810-816

49
Conclusions et perspectives de recherche

Il existe aujourd'hui de nombreux types de retardateurs de flamme, ceux-ci étant incorporés dans les produits et matériaux concernés (textiles, rideaux, vêtements, sièges, plastiques, mousses, capitonnages, résines, circuits imprimés, câbles, téléviseurs, ordinateurs...) à des teneurs allant en général de 5 à 20 %. Les retardateurs de flamme bromés (RFB) représentent 30 % des retardateurs de flamme utilisés au niveau européen. Trois groupes chimiques dominent les usages courants : les polybromo-diphényléthers (PBDE), le 1,2,5,6,9,10 hexabromocyclododécane (HBCD) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA). La réglementation européenne interdit depuis août 2004 deux mélanges « techniques » de PBDE historiquement utilisés industriellement, à savoir l'octa-BDE et le penta-BDE (ou mélange DE-71), mais autorise encore le mélange déca-BDE (BDE 209). Les PBDE ne sont pas liés aux matériaux par des liaisons chimiques, mais par un phénomène physique, et peuvent par conséquent faire l'objet d'un relargage depuis les matériaux dans certaines conditions. Le TBBPA a une structure chimique proche de celle du BPA, avec deux cycles aromatiques liés par un pont carbone. Contrairement aux PBDE, le TBBPA est un composé utilisé en tant que réactif dans les matériaux, donc avec une liaison forte. Le HBCD « technique » est un mélange principalement constitué de trois diastéréoisomères qui se répartissent dans la proportion d'environ 70 à 95 % de γ-HBCD pour 5 à 30 % d'α- et de β-HBCD. Ces composés se caractérisent globalement par des propriétés physico-chimiques qui les rendent lipophiles et bioaccumulables, au même titre que certains autres polluants organiques persistants (POP) halogénés (dioxines, polybromobiphényls).

La génération de données précises et fiables d'exposition et d'imprégnation concernant les retardateurs de flamme bromés représente un challenge sur le plan analytique tant pour la préparation des échantillons biologiques (procédures d'extraction et de purification lourdes) que pour la mesure de ces molécules (la méthode de choix reste le couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse haute résolution). Il faut souligner la difficulté de gestion des contaminations environnementales pour ces contaminants ubiquistes ce qui pourrait être à l'origine de disparités s'agissant de la distribution des niveaux de concentration mesurés sur un même jeu d'échantillons mais sur la base de méthodologies différentes. Les différentes études disponibles

n'ayant pas toutes recherché les mêmes congénères PBDE, ceci rend délicate la comparaison des valeurs médianes d'exposition et d'imprégnation rapportées. De façon très générale, les valeurs d'exposition aux PBDE estimées sont de l'ordre de 50 à 150 ng/j. Pour l'adulte en population générale, ces valeurs apparaissent assez largement en deçà des valeurs NOAEL estimées par rapport à des effets neurodéveloppementaux ou sur la spermatogenèse, mais restent préoccupantes pour des sous-populations particulièrement exposées (par exemple les forts consommateurs de poissons) et/ou à risque (fœtus, nourrisson…). La présence de plusieurs représentants de cette classe de polluants chimiques dans certains fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum ou le lait maternel, les teneurs observées sont de façon générale de l'ordre de quelques ng/g de lipide. Une tendance à une diminution des niveaux d'imprégnation a été rapportée pour les principaux congénères de type PBDE depuis le début des années 2000, correspondant à un arrêt de la production et de l'utilisation des deux mélanges industriels penta- et octa-BDE. En revanche, cette observation ne concerne pas le BDE 209, le HBCD ou encore le TBBPA, les données disponibles concernant ces deux dernières substances sont extrêmement limitées voire inexistantes.

Les études épidémiologiques sont encore trop peu nombreuses pour conclure à un rôle possible des PBDE sur la santé reproductive de l'homme et la femme. Alors que certaines études reposent sur des échantillonnages cliniques et peu détaillés et ayant des effectifs souvent faibles, d'autres études d'effectif plus élevé suggèrent des résultats préoccupants (augmentation du délai pour concevoir, perturbation des taux d'hormones LH, cryptorchidie…) qui doivent être confirmés ou infirmés par de nouvelles études. Les mécanismes sous-jacents doivent de plus être élucidés. Dans les études disponibles, il est difficile de distinguer le rôle des PBDE des autres polluants organiques persistants, tels que les PCB, ayant des structures et des mécanismes d'action similaires aux PBDE, ainsi que des sources potentielles d'exposition communes. Une limite importante des études est ainsi l'absence de la prise en compte de ces co-expositions. La liste des composés bromés analysés dans les études existantes est constituée des PBDE uniquement. Dans ces études, les 4 congénères BDE 47, 153, 99, 100 sont le plus souvent retrouvés.

Dans les études animales, des effets reprotoxiques tels qu'une modification de la distance anogénitale chez le mâle, un retard pubertaire dans les deux sexes, une diminution de la production spermatique et des taux de testostérone, une modification de certains paramètres fonctionnels spermatiques ou encore une diminution du nombre de follicules ovariens ont été observés après exposition gestationnelle ponctuelle ou exposition pubertaire et adulte avec les composés BDE 99 et 209. Cependant, les doses utilisées semblent très supérieures aux expositions estimées chez l'homme. Les effets délétères sur la fonction thyroïdienne peuvent alerter sur le possible impact indirect sur la fonction de reproduction compte tenu des interrelations entre ces deux fonctions.

Si les quelques congénères PBDE les plus abondants ont fait l'objet de plusieurs études, il est à noter un manque très net de données concernant les composés qui par ailleurs restent ceux autorisés aujourd'hui en tant que retardateurs de flamme, incluant le déca-BDE, le HBCD et le TBBPA, ceci tant en termes d'exposition, d'imprégnation, de métabolisme, pharmacocinétique, que de lien avec certains paramètres cliniques.

VIII

Composés perfluorés (PFC)

Introduction

Le terme « composés perfluorés » (PFC), ou encore « substances perfluoroalkylées » (PFAS), réfère à une vaste famille de molécules chimiques comprenant des oligomères et des polymères, qui correspondent à des composés tensio-actifs, neutres ou anioniques, présentant une grande stabilité sur les plans thermique, chimique et biologique.

Les PFC sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles, notamment pour les traitements anti-taches et imperméabilisants de textiles (vêtements, tissus, tapis, moquettes...), les enduits résistants aux matières grasses pour les emballages en papier et/ou carton autorisés pour le contact alimentaire, les revêtements anti-adhésifs, les mousses anti-incendie, les tensioactifs utilisés dans l'exploitation minière et les puits de pétrole, les cires à parquet, ou encore certaines formulations d'insecticides. En conséquence, les consommateurs des pays industrialisés sont aujourd'hui en contact avec ces composés dans leur vie quotidienne, à travers un grand nombre de produits manufacturés. Parallèlement, comme beaucoup d'autres polluants chimiques d'origine anthropique, les PFC peuvent être relargués dans l'environnement à chaque étape de leur cycle de vie, puis retrouvés dans la chaîne alimentaire et *in fine* dans les organismes vivants.

De par leur structure chimique comportant d'une part une chaîne carbonée polyfluorée apolaire et d'autre part un groupement fortement polaire, les PFC se caractérisent par des propriétés à la fois hydrophobes et lipophobes, et de ce fait ne s'accumulent pas dans les tissus adipeux comme cela est le cas pour d'autres polluants organiques persistants halogénés.

Un sous-groupe important au sein de cette famille est celui des tensio-actifs organiques (per)fluorés, auquel appartiennent le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), qui présentent tous deux une chaîne carbonée à huit atomes (figure 1). Ces deux composés étant par ailleurs les principaux produits de dégradation finaux de nombreux PFC, ils sont par conséquent retrouvés de façon généralement prépondérante dans les matrices environnementales ou biologiques, et sont le plus souvent les principaux voire les seuls composés étudiés dans les études consacrées aux PFC.

De nombreux autres représentants de cette famille (tableau I) sont toutefois également à considérer sur le plan de l'évaluation du risque. Le PFOS (sulfonate de perfluorooctane) a été récemment inclus dans la liste des polluants

persistants de la convention de Stockholm (UNEP – *United Nations Environment Programme*[23] – ; Wang et coll., 2009). Depuis 2006, le PFOS est interdit dans certains usages par la réglementation européenne.

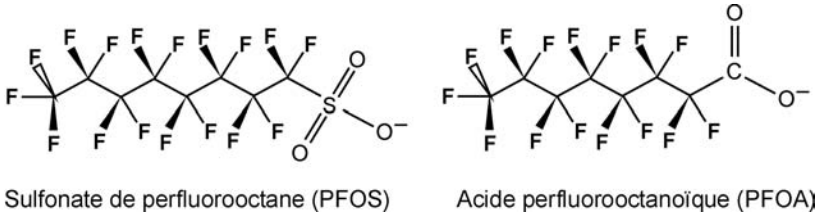


Figure 1 : Structures chimiques du sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA)

Tableau I : Noms et structures chimiques des principaux composés perfluorés ciblés dans les différentes études disponibles

Abréviation	Nom usuel	Structure chimique	N° CAS
PFBA	Acide perfluorobutanoïque	$F(CF_2)_3CO_{2-}$	375-22-4
PFPA	Acide perfluoropentanoïque	$F(CF_2)_4CO_{2-}$	356-42-3
PFHxA	Acide perfluorohexanoïque	$F(CF_2)_5CO_{2-}$	307-24-4
PFHpA	Acide perfluoroheptanoïque	$F(CF_2)_6CO_{2-}$	375-85-9
PFOA	Acide perfluorooctanoïque	$F(CF_2)_7CO_{2-}$	335-67-1
PFNA	Acide perfluorononanoïque	$F(CF_2)_8CO_{2-}$	375-95-1
PFDA	Acide perfluorodecanoïque	$F(CF_2)_9CO_{2-}$	335-76-2
PFUnA	Acide perfluoroundecanoïque	$F(CF_2)_{10}CO_{2-}$	2058-94-8
PFDoA	Acide perfluorododecanoïque	$F(CF_2)_{11}CO_{2-}$	307-55-1
PFTrDA	Acide perfluorotridecanoïque	$F(CF_2)_{12}CO_{2-}$	72629-94-8
PFTeDA	Acide perfluorotetradecanoïque	$F(CF_2)_{13}CO_{2-}$	376-06-7
PFBS	Perfluorobutane sulfonate	$F(CF_2)_4SO_{3-}$	375-73-5
PFHxS	Perfluorohexane sulfonate	$F(CF_2)_6SO_{3-}$	355-46-4
PFHpS	Perfluoroheptane sulfonate	$F(CF_2)_7SO_{3-}$	-
PFOS	Perfluorooctane sulfonate	$F(CF_2)_8SO_{3-}$	1763-23-1
PFDS	Perfluorodecane sulfonate	$F(CF_2)_{10}SO_{3-}$	13419-61-9
PFOSA	Perfluorooctyl sulfonamide	$F(CF_2)_8SO_3NH_2$	754-91-6
8:2 FTOH	8:2 Perfluorohexyl ethanol	$F(CF_2)_6CH_2CH_2OH$	678-39-7

23. http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Publications

Les études concernant les contaminants perfluorés en général, et en particulier leur lien potentiel avec des troubles de santé chez l'homme, restent relativement peu nombreuses, surtout en comparaison des études dédiées à d'autres perturbateurs endocriniens comme par exemple le bisphénol A.

Bibliographie

UNEP. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. http://chm.pops.int/

WANG T, WANG Y, LIAO C, CAI Y, JIANG G. Perspectives on the inclusion of perfluorooctane sulfonate into the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *Environ Sci Technol* 2009, **43** : 5171-5175

50
Exposition des populations

La source alimentaire apparaît comme la voie d'exposition principale aux contaminants perfluorés, en particulier pour l'adulte. D'autres sources secondaires, notamment via le contact direct avec certains revêtements de type tapis ou moquette, représentent toutefois une voie non négligeable d'exposition pour les jeunes enfants.

Sources et voies d'exposition

L'étude de Trudel et coll. (2008) s'est attachée à estimer l'exposition globale des consommateurs européens et nord-américains au PFOS et PFOA, tout en identifiant les principales sources environnementales et/ou les produits manufacturés responsables de cette exposition. Sur la base des données et scénarios utilisés, les valeurs obtenues varient de 3 à 200 ng/kg/j pour le PFOS et de 1 à 320 ng/kg/j pour le PFOA. Les valeurs hautes pour la population générale adulte européenne sont de 52,5 et de 41,7 ng/kg/j pour le PFOS et le PFOA, respectivement. L'exposition alimentaire (incluant l'eau de boisson) a été identifiée comme source majeure, l'exposition via les produits manufacturés tels que les textiles, via les emballages alimentaires, ou enfin via l'inhalation de poussières, représentant une part mineure pour l'adulte. Les enfants apparaissent en revanche davantage exposés en raison d'une part d'un rapport exposition/poids corporel plus grand et d'autre part d'un contact direct plus important avec certains produits manufacturés tels que les tapis et les moquettes.

Une seconde étude (Fromme et coll., 2009) a abouti à la même conclusion s'agissant de la prévalence de la voie d'exposition alimentaire, mais avec toutefois des valeurs hautes significativement plus faibles pour la même population adulte européenne, soit de 8,8 et 12,6 ng/kg/j pour le PFOS et le PFOA, respectivement.

Une troisième étude conduite par l'US EPA (Egeghy et Lorber, 2010) a également estimé l'exposition globale au PFOS de la population nord-américaine. Les valeurs moyennes calculées pour ce composé et pour l'adulte varient de 1,6 à 24,2 ng/kg/j selon les scénarios retenus, valeurs globalement du même ordre de grandeur que celles estimées par l'étude précédente pour la population européenne.

L'étude de Haug et coll. (2010), conduite sur 175 sujets norvégiens, a toutefois rapporté des valeurs d'exposition alimentaire significativement plus faibles : 1,5 et 0,6 ng/kg/j pour le PFOS et le PFOA, respectivement. La contribution majeure du poisson et des produits de la mer à cette exposition a été de plus soulignée, celle-ci s'élevant d'après les modèles utilisés à 81 % et 38 % pour le PFOS et le PFOA, respectivement.

Pour Pistochi et Loos (2009), le compartiment aquatique représente le principal réservoir environnemental pour les PFC, la quantité totale de PFOS et de PFOA présente dans l'ensemble du réseau fluviatile européen ayant été estimée entre 20 et 30 tonnes en 2007.

S'agissant de l'exposition professionnelle, Steenland et coll. (2009) ont confirmé que le principal prédicteur des taux sériques de PFOA était le temps de résidence dans l'usine productrice et dans la zone contaminée (n=46 294 sujets). Les niveaux d'imprégnation observés sont apparus significativement supérieurs chez les hommes, ainsi que chez les consommateurs de légumes et d'eau d'origine locale. Enfin, les concentrations mesurées en PFOA sont apparues plus fortes pour les sujets à la fois les plus jeunes et les plus âgés.

Biomarqueurs d'exposition

L'étude de Midasch et coll. (2006) conduite en population générale allemande a étudié les taux plasmatiques de PFOS et PFOA chez 105 sujets âgés de moins de 10 à plus de 80 ans. Des taux médians de 22,3 et de 6,8 µg/l ont été mesurés pour le PFOS et le PFOA, respectivement. Aucune corrélation significative n'est apparue entre ces valeurs et l'âge des sujets. En revanche, une différence de taux d'imprégnation significative a été observée entre les femmes et les hommes, ces derniers présentant des niveaux de contamination plus élevés d'environ 40 %.

Toms et coll. (2009) ont également mesuré les taux de six PFC (PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA, Me-PFOSA-AcOH, PFDeA) dans des pools (n=84) de sérums collectés chez des sujets australiens (n=2 420) d'âge variant entre quelques mois et plus d'une soixantaine d'années. Les concentrations moyennes de ces six PFC ont été observées à 15,2, 6,4, 3,1, 0,8, 0,7 et 0,3 µg/l, respectivement. Une différence inter-sexe du même type que celle rapportée dans l'étude précédente a été observée chez l'adulte (taux circulants inférieurs chez la femme) mais pas chez l'enfant de moins de 12 ans. Si les concentrations en PFOS sont apparues supérieures chez les sujets âgés de plus de 60 ans, la tendance inverse a été observée pour les autres PFC ciblés (concentrations supérieures pour les enfants de moins de 15 ans).

Kärrman et coll. (2010) ont déterminé les niveaux de PFC dans des échantillons de foie (n=12) et de lait maternel (n=10) collectés chez des sujets

adultes espagnols entre 2007 et 2008. Dans le foie, le PFOS a été détecté à un niveau moyen de 26,6 µg/kg. Six autres PFC dont le PFOA et le PFHxS ont également été retrouvés, à des niveaux variant de 0,50 à 1,45 µg/kg. Dans le lait maternel, seuls le PFOS et le PFHxS ont été détectés à des niveaux moyens de 0,12 et 0,04 µg/l, respectivement. La comparaison de ces résultats avec des mesures réalisées dans le sérum d'individus de la même région a indiqué d'une part que les niveaux de contamination observés dans le lait maternel représentent moins de 1 % des taux mesurés dans le sérum, probablement en raison d'un lien particulier entre les PFC et les protéines du sang, ce qui limite leur transfert vers le lait maternel (*a contrario* d'autres types de polluants plus lipophiles transférés dans le lait maternel via la matière grasse), et d'autre part que les taux sériques peuvent être largement inférieurs aux taux mesurés dans le foie pour certains composés (PFOS, acides carboxyliques à longue chaîne type PFDA, PFUnA) ou au contraire supérieurs (d'un facteur proche ou supérieur à 10) pour le PFOA et le PFHxS.

L'étude de Roosens et coll. (2010) s'est également attachée à déterminer, pour une population flamande, les niveaux de concentration en PFOS et PFOA dans un ensemble d'échantillons de sérum collectés chez des sujets âgés de 14 à 65 ans. Les niveaux de concentrations en PFOS retrouvés dans ces échantillons (8 pools de 48 à 197 prélèvements regroupés selon leur origine géographique et la classe d'âge des sujets) varient de 34,9 à 64,4 µg/l pour les adolescents (médiane : 44,8), et de 9,1 à 171 µg/l pour les adultes (médiane : 62,5). S'agissant du PFOA, ces concentrations sériques varient de 1,8 à 3,8 µg/l pour les adolescents (médiane : 2,9), et de 1,4 à 3,4 µg/l pour les adultes (médiane : 2,0). Ces valeurs apparaissent globalement cohérentes avec les résultats publiés par les autres études européennes sur ce sujet (tableau 50.I). La question d'une éventuelle corrélation entre ces niveaux d'imprégnation et l'âge reste en revanche débattue, même si l'observation d'une imprégnation plus forte pour les jeunes enfants et adolescents semble récurrente au sein des différentes études disponibles, probablement en lien avec des voies de contamination directe évoquées plus haut.

L'étude de Harada et coll. (2010) a rapporté des données similaires pour des sujets asiatiques originaires du Japon (n=150), de Corée (n=71), et du Vietnam (n=37). Les moyennes géométriques observées pour ces trois populations sont de 6,2, 8,4, 6, 8 µg/l pour le PFOS, et de 4,1, 3,5, 0,6 µg/l pour le PFOA, respectivement.

L'étude de Hemat et coll. (2010) s'est intéressée à une population afghane (n=55 sujets âgés de 2,5 à 65 ans). Les teneurs mesurées pour le PFOS dans le sérum de ces individus varient de 0,2 à 11,8 µg/l. Des valeurs significativement plus faibles pour les sujets féminins ont été retrouvées dans cette étude, en accord avec plusieurs études précédemment citées. En raison d'une faible proportion d'échantillons dans lesquels les autres PFC ciblés ont été détectés, les données concernant notamment le PFOA n'ont toutefois pas été détaillées dans cette étude qui semble indiquer des niveaux d'imprégnation en

PFC significativement plus faibles dans les pays d'un niveau de développement sensiblement inférieur à celui des pays industrialisés.

Tableau 50.I : Synthèse des différentes études publiées relatives aux niveaux de concentration en PFC dans le sérum (médiane [min-max])

Référence	Population (Pays)	Nombre d'échantillons	PFOS (µg/l)	PFOA (µg/l)	Autres PFC (ng/l)
Midasch et coll., 2006	Allemagne	105	22,3 [6,2-130,7]	6,8 [1,7-39,3]	
Calafat et coll., 2007	États-Unis	2 094	20,7	3,9	PFHxS : 1,9 PFNA : 1,0
Ericson et coll., 2007	Espagne	48	7,6 [0,76-16,2]	1,65 [0,79-3,13]	PFHxS : 2,92 [0,65-20,0] PFNA : 0,41 [nd-1,49] PFOSA : 0,35 [nd-1,35]
Toms et coll., 2009	Australie	84 (pools) (2 420 sujets)	14,8 [5,0-28,5]	6,4 [0,8-9,1]	PFHxS : 2,9 [<LOD-11,3] PFNA : 0,8 [0,1-1,4] PFDeA : 0,3 [<LOD-0,8]
Roosens et coll., 2010	Belgique (adultes)	8 (pools) (1 515 sujets)	62,5 [9,1-171]	2,0 [1,4-3,4]	PFHxS : [0,5-8,1] PFNA : [1,1-3,2] PFDA : [1,0-2,9]
	Belgique (adolescents)	8 (pools) (1 286 sujets)	44,8 [34,9-64,4]	2,9 [1,8-3,8]	PFHxS : [0,03-1,2] PFNA : [0,6-1,1] PFDA : [0,5-1,7]
Harada et coll., 2010	Japon	150	6,19 [1,99-26,9]	4,10 [0,77-169]	
	Corée	71	8,43 [3,21-19,1]	3,48 [1,67-9,0]	
	Vietnam	37	6,78 [1,89-14,6]	0,58 [nd-1,57]	
Hemat et coll., 2010	Afghanistan	55	[0,2-11,8]	-	

Au-delà d'une variabilité interindividuelle classiquement observée pour la mesure de tels polluants chimiques, la disparité de résultats rapportés pour le PFOS peut poser question. En effet, les études disponibles font globalement état soit de teneurs inférieures à 10 µg/l, soit supérieures (parfois largement) à 20 µg/l. Une des hypothèses pouvant expliquer ce constat est l'existence de formes à la fois linéaires et ramifiées de certains PFC, dont le PFOS (Arsenault et coll., 2008a ; Chu et Letcher, 2009 ; Keller et coll., 2010). La forme linéaire est la plus usuellement considérée tant sur le plan de la toxicologie

que de l'expologie. Toutefois, en fonction de la procédure analytique utilisée, le signal finalement mesuré pourrait être parfois imputable à la somme des formes linéaires et ramifiées. Dans le cas où ces différentes formes sont séparées chromatographiquement, leur quantification soit distincte soit cumulée peut être l'option choisie, sans forcément de justification (Riddell et coll., 2009). Cet aspect pourtant majeur en termes de conséquences sur le plan quantitatif est toutefois très rarement abordé dans les études disponibles. La présence de composés interférents matriciels pouvant introduire une erreur de quantification de certains PFC est également un aspect déjà observé (Arsenault et coll., 2008b) mais néanmoins non encore systématiquement évalué dans les différentes études publiées. Sans remettre en cause de façon globale ni les différentes études disponibles, ni même l'ordre de grandeur des niveaux d'imprégnation aux PFC rapportés, ces éléments sont néanmoins à prendre en compte dans l'optique d'une évaluation du risque précise liée à ces composés.

Tendances séculaires

Une étude réalisée à partir de prélèvements sanguins collectés par des banques du sang aux États-Unis (Calafat et coll., 2007) a montré des traces de PFOA, PFOS, PFHxS et PFNA dans 98 % des prélèvements analysés (n=2 094), avec toutefois des différences significatives inter-ethniques et inter-sexes (taux globalement inférieurs chez la femme), suggérant des disparités en terme de sources d'exposition et/ou de pharmacocinétique. En revanche, aucune relation significative n'a été observée avec l'âge (seul le PFHxS présente un taux chez l'adulte supérieur à celui observé chez l'enfant), à l'inverse d'autres polluants plus lipophiles. Les concentrations mesurées varient de <0,4 µg/l à 435 µg/l pour le PFOS, de <0,1 µg/l à 77,2 µg/l pour le PFOA, de <0,3 µg/l à 82 µg/l pour le PFHxS, et de <0,1 µg/l à 11,5 µg/l pour le PFNA. Une tendance à la décroissance de ces taux d'imprégnation a été notée entre la période 1999-2000 et la période 2003-2004 (diminution de 32, 25 et 10 % pour le PFOS, PFOA et PFHxS, respectivement), avec l'hypothèse d'un lien direct avec l'arrêt de la production de PFOS et de certains dérivés perfluorés en 2002 par la compagnie 3 M. Une étude de comparabilité des deux méthodologies utilisées pour ces mesures lors de ces deux campagnes semble exclure un effet analytique dans cette tendance observée.

La même tendance séculaire pour la population américaine a été observée par une autre étude (Olsen et coll., 2008) qui a déterminé en 2006 les taux de PFC dans le sang de volontaires donneurs (n=600), également répartis par classe d'âge, et recueillis par 6 centres de la Croix Rouge. Les valeurs obtenues sont globalement apparues 60, 25 et 30 % plus faibles que les niveaux de référence disponibles pour la période 2000-2001 pour le PFOS, le PFOA et le PFHxS, respectivement. Comme dans le cas de la précédente étude, les auteurs relient cette observation à la fois à l'arrêt de la production de PFOS et

de ses dérivés par la compagnie 3M en 2002 et au temps de demi-vie relativement cours de ces polluants.

Exposition fœtale

Une étude japonaise (Inoue et coll., 2004) a étudié les taux circulants de PFOS, PFOA et PFOSA dans le sang maternel et le sang du cordon de 15 paires mère-nourrisson. Les résultats obtenus ont montré la présence de PFOS à des niveaux de concentration variant de 4,9 à 17,6 µg/l chez la mère et de 1,6 à 5,3 µg/l dans le sang du cordon, avec des valeurs moyennes de 8,9 *versus* 2,9 µg/l, respectivement. Des traces de PFOA ont été détectées seulement dans 4 des 15 échantillons de sang maternel (de <0,5 à 2,3 µg/l) mais dans aucun échantillon de sang du cordon. Le PFOSA n'a été détecté dans aucun échantillon. La corrélation entre les teneurs en PFOS dans le sang maternel et dans le sang du cordon est apparue significative (R=0,94).

Une étude canadienne (Monroy et coll., 2008) a également étudié les taux de 6 PFC (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS, PFDeA, PFHpA) dans le sang maternel et le sang du cordon chez une centaine de paires mère-nourrisson. En accord avec les résultats de l'étude précédente, les concentrations mesurées pour le PFOS sont apparues plus élevées dans le sang de la mère que dans le sang du cordon (16,2 *versus* 7,3 µg/l, respectivement). En revanche, à l'inverse de l'étude précédente, le PFOA a également été détecté dans tous les échantillons, mais les concentrations observées ne semblent pas différentes pour ce composé selon le compartiment considéré (moyennes de 2,2 *versus* 1,9 µg/l dans le sang maternel et le sang du cordon, respectivement). Si les concentrations mesurées pour le PFNA paraissent globalement très faibles (<1 µg/l), celles mesurées pour le PFHxS se situent entre les valeurs obtenues pour le PFOS et le PFOA (moyennes de 4,0 *versus* 5,0 µg/l dans le sang maternel et le sang du cordon, respectivement).

L'étude danoise de Fei et coll. (2007) a rapporté des taux plasmatiques pour le PFOS et PFOA de 35,3 et 5,6 µg/l dans le sang maternel et de 11,0 et 3,7 µg/l dans le sang du cordon, respectivement.

L'étude récente de Roosens et coll. (2010) s'est également attachée à déterminer, pour une population flamande, les niveaux de concentration en PFOS et PFOA dans un ensemble d'échantillons de sérum du cordon. Les niveaux de concentration retrouvés dans ces échantillons (pools de 48 à 197 prélèvements regroupés selon leur origine géographique et la classe d'âge des sujets) varient de 0,8 à 15,8 µg/l pour le PFOA (médiane : 5,1), et de <LOD à 9,5 µg/l pour le PFOA (médiane : 0,6).

Exposition du nourrisson

L'étude espagnole de Kärrman et coll. (2010) s'étant intéressée aux taux de PFC dans 10 échantillons de lait maternel, a fait un état des lieux concernant les données disponibles relatives à cette matrice (tableau 50.II). Globalement, les niveaux de concentration observés pour le PFOS et le PFOA varient de quelques dizaines à quelques centaines de ng/l, soit environ 10 à 100 fois inférieurs aux niveaux résiduels globalement mesurés dans le sérum. L'ordre de grandeur de ces valeurs (0,020 à 0,700 µg/l) est également celle retrouvée dans trois autres études non encore publiées qui concernent respectivement une population danoise (n=60), une population française (n=50), et une sous-population française de la région Grand-Ouest (n=30) (Antignac et coll., communication personnelle). Toutefois, l'exposition aux PFC du nourrisson allaité peut apparaître non négligeable si l'on considère d'une part la durée de cet allaitement et d'autre part la quantité totale ingérée sur cette période.

L'étude flamande de Roosens et coll. (2010) a rapporté respectivement pour le PFOS et le PFOA des concentrations variant de <0,4 à 28,2 µg/l (médiane : 2,9) et de <0,3 à 3,5 µg/l (médiane : 0,3), ces valeurs apparaissant cohérentes avec les résultats d'autres études européennes pour le PFOA mais en revanche significativement supérieures pour le PFOS.

Tableau 50.II : Synthèse des différentes études publiées relatives aux niveaux de concentration en PFC dans le lait maternel (médiane [min-max])

Référence	Population (Pays)	Nombre d'échantillons	PFOS (µg/l)	PFOA (µg/l)	Autres PFC (µg/l)
So et coll., 2006	Chine	19	0,100 [0,045-0,360]	0,110 [0,047-0,210]	PFHxS : 0,011 [0,004-0,100] PFNA : 0,016 [0,0063-0,062] PFDA : 0,066 [0,00388-0,015] PFUnDA : 0,017 [0,0076-0,056]
Kärrman et coll., 2007	Suède	12	0,166 [0,060-0,470]	nd [<0,209-0,492]	PFHxS : 0,070 [0,031-0,172] PFOSA : 0,010 [0,007-0,030]
Llorca et coll., 2010	Espagne	20	0,084 [0,028-0,865]		
Liu et coll., 2010	Chine	24 pools (1 237 sujets)	0,049 [0,006-0,0137]	0,0345 [<LOD-0,814]	

Référence	Population (Pays)	Nombre d'échantillons	PFOS (µg/l)	PFOA (µg/l)	Autres PFC (µg/l)
Roosens et coll., 2010	Belgique	22 (pools) (3 à 16 sujets/ pool)	2,900 [<0,400-28,200]	0,300 [<0,300-3,500]	
Völkel et coll., 2008	Allemagne (Munich)	19	0,113 [0,028-0,239]		
	Allemagne (Leipzig)	38	0,123 [0,033-0,309]		
	Hongrie	13	0,330 [0,096-0,639]		
Tao et coll., 2008	États-Unis	45	0,106 [<0,032-0,617]	0,0361 [<30-161]	PFHxS : 0,012 [<0,012-0,064]
	Cambodge	24	0,0399 [0,0172-0,327]		PFNA : 0,0070 [<0,005-0,018]
	Vietnam	40	0,0585 [0,0169-0,393]		PFHxS : 0,004 [0,0016-0,0268]
	Indonésie	20	0,0672 [0,0254-0,256]		PFHxS : 0,0133 [<0,0016-0,059]
	Philippines	24	0,104 [0,02727-0,208]		PFHxS : 0,007 [<0,0016-0,0133]
	Malaisie	13	0,111 [0,0487-0,350]		
	Inde	39	0,0394 [<0,011-0,120]		
	Japon	24	0,196 [0,140-0,523]	0,0777 [<0,0425-0,170]	PFHxS : 0,00645 [<0,0016-0,0182]
Nakata et coll., 2007	Japon	51	nd [0,008-0,401]	nd <LOD-0,339	PFHxS : [<LOD-0,025] PFNA : [<LOD-0,150]
Bernsmann et Fürst, 2008	Allemagne	203	0,082 [0,050-0,284]	0,090 [250,-610]	
Kärrman et coll., 2010	Espagne	10	0,110 [0,070-0,220]	nd <0,500	

LOD : *limit of detection*

Comme dans le cas du sérum, la disparité des teneurs en PFC rapportées dans le lait humain pourrait être liée, outre à la variabilité interindividuelle, à des aspects d'interférents matriciels et/ou de prise en compte ou non des formes ramifiées avec les formes linéaires qui ne peuvent en l'état pas être précisément établis.

Dose journalière tolérable

Dans son rapport scientifique rendu public en 2008[24] , le panel Contam de l'Agence européenne pour la sécurité des aliments (EFSA) a établi une valeur de dose journalière tolérable pour le PFOS égale à 0,150 µg/kg/j, qui apparaît significativement supérieure (d'un facteur 3 à 17) aux valeurs d'exposition estimées par les études précédentes. Selon ce panel, la sous-population des gros consommateurs de poisson apparaît toutefois à risque, l'apport alimentaire en PFOS via le poisson ayant été estimé dans ce cas à 0,200 µg/kg/j. Concernant le PFOA, le même panel Contam de l'EFSA a établi une valeur de dose journalière tolérable de 1,5 µg/kg/j, qui apparaît de même très significativement supérieure aux valeurs d'exposition évaluées et disponibles dans la littérature.

Toxicocinétique

Les résultats de toxicocinétique concernant le PFOA et PFOS sont issus de l'expérimentation animale (rat, singe) et de données obtenues chez des sujets exposés en milieu professionnel ou par l'eau de boisson.

Données issues de l'expérimentation animale

Les études expérimentales concernant la toxicocinétique des PFC sont peu nombreuses, parfois non publiées dans la littérature scientifique et traitent principalement du devenir de PFOS et PFOA chez les rongeurs. Elles montrent que pour ces deux types de composés, l'absorption digestive est importante à faible dose chez le rat : près de 93 et 95 % pour respectivement PFOA et PFOS (EFSA, 2008). Pour ces deux composés, l'analyse de la distribution tissulaire indique que la majeure partie des résidus se trouve dans le foie et dans une moindre mesure dans le rein (Vanden Heuvel et coll., 1991 ; Austin et coll., 2003). La rétention préférentielle des PFC au niveau du foie est vraisemblablement due à la liaison de ces composés à une protéine impliquée dans le transport des acides gras, la *liver fatty-acid binding protein*, ou L-FABP (Luebker et coll., 2002). Des expérimentations menées chez des rates en gestation indiquent que PFOS et PFOA sont capables de franchir la barrière placentaire et sont principalement retrouvés dans le foie du fœtus (Thibodeaux et coll., 2003 ; Hinderliter et coll., 2005). S'il existe quelques données montrant que les précurseurs de PFOA peuvent être métabolisés *in vivo* par des rongeurs (Kudo et coll., 2005 ; Fasano et coll., 2006) ou *in vitro* par des fractions subcellulaires et des hépatocytes humains ou de rongeurs (Nabb et

24. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902012410.htm

coll., 2007), il n'existe aucune évidence de la biotransformation de PFOS ou PFOA chez les vertébrés.

Chez le rat, l'exposition par voie alimentaire au PFOS pendant plusieurs semaines conduit à une accumulation, principalement au niveau du foie (Seacat et coll., 2003). Alors que les résidus hépatiques sont similaires chez les individus mâles et femelles, les concentrations sériques sont 30 à 40 % plus élevées chez les femelles.

Chez le singe cynomolgus mâle et femelle recevant par voie orale pendant 183 jours des doses quotidiennes de 0,03, 0,15, 0,75 mg de PFOS/kg pc (Seacat et coll., 2002), les concentrations sériques n'atteignent un plateau (correspondant à environ 170 mg/l) qu'au-delà de 100 jours de traitement et uniquement pour les individus ayant reçu la plus forte dose. Aucune différence liée au sexe n'a été observée dans cette étude et l'accumulation de résidus dans le foie observée chez les rongeurs est bien plus limitée chez le singe.

Chez le rat, l'élimination de PFOS se fait préférentiellement dans l'urine (Cui et coll., 2010). Sa demi-vie a été estimée à plus de 90 jours chez le rat, à environ 200 jours chez le singe cynomolgus et à 5-6 ans chez l'homme (Seacat et coll., 2002 ; Olsen et coll., 2007 ; EFSA, 2008). Ces différences pourraient être principalement dues à une clairance rénale réduite chez les primates en raison d'une forte affinité de PFOS pour des protéines de transport des anions telle que oatp1 et oatp2 capables de favoriser sa résorption au niveau du rein (Harada et coll., 2005 ; Andersen et coll., 2006 et 2008 ; Tan et coll., 2008).

La singularité des études de métabolisme concernant le PFOA tient à la forte différence entre mâles et femelles pour ce qui concerne l'élimination urinaire. Vanden Heuvel et coll. (1991) observent que chez les femelles 91 % d'une dose unique de PFOA radiomarqué sont éliminés dans l'urine au cours des premières 24 h, contre 6 % chez les mâles traités par la même dose. Un écart moindre a été observé par Kudo et coll. (2001) chez des rats traités par injection intrapéritonéale (20 mg/kg pc) et suivis pendant 120 h (55 % de la dose éliminée dans l'urine chez les mâles contre 80 % chez les femelles). Après castration, les mâles ont un taux d'élimination urinaire semblable à celui des femelles, suggérant une implication des protéines oatp dans cette différence inter-sexe (Kudo et coll., 2002). Ces différences sont beaucoup moins marquées chez les primates non humains et chez l'homme (Burris et coll., 2002 ; Noker et Gorman, 2003).

Chez le rat, la demi-vie de PFOA est estimée à 1,9–24 h pour les femelles et à 4,4-9 jours pour les mâles (EFSA, 2008). Chez le singe cynomolgus, elle est de 20-40 jours et chez l'homme d'environ 4-5 ans (Tan et coll., 2008).

Les données sur les autres PFC sont rares. L'étude de Xie et coll. (2009) a montré, chez la rate Sprague-Dawley (n=9) exposée oralement au N-éthylperfluorooctanesulfonamidoéthanol (N-EthFOSE) durant 21 jours (5 mg/kg), que ce composé était essentiellement métabolisé en PFOS.

L'étude de Henderson et coll. (2007) a montré chez la souris que le 8-2 fluorotélomère alcool (FTOH) était également largement métabolisé en PFOA et PFNA, et que ces produits de dégradation finaux étaient transférés à la descendance à la fois pendant la gestation et pendant la lactation.

Données obtenues chez l'homme

La première estimation de référence concernant la demi-vie du PFOS et du PFOA chez l'homme provient d'une étude menée sur des travailleurs exposés de façon professionnelle avant de cesser leur activité (Burris et coll., 2002). Les valeurs moyennes obtenues sont de 4,4 et de 8,7 années pour le PFOS et le PFOA, respectivement. Une seconde étude plus récente (Olsen et coll., 2007), également conduite sur des sujets (n=26) exposés professionnellement, a abouti à des valeurs de demi-vie égales à 5,4, 3,8 et 8,5 années pour le PFOS, le PFOA et le PFHxS, respectivement.

Une étude allemande (Hölzer et coll., 2009) conduite sur des sujets exposés au PFOA via l'eau de boisson en 2006 et suivis durant une année après l'arrêt de cette exposition, a quant à elle montré une décroissance de 10, 17 et 20 % du taux d'imprégnation plasmatique pour les hommes (n=82), les femmes (n=138) et les enfants (n=68), respectivement, en accord avec la durée de vie de quelques années reconnue pour ces polluants perfluorés chez l'homme.

Andersen et coll. (2006) puis Olsen et coll. (2009) ont fait état pour le PFBS, d'une demi-vie significativement plus courte que pour d'autres PFC à chaîne carbonée plus longue comme le PFOS ou le PFOA (quelques semaines contre quelques années).

L'étude d'Ehresman et coll. (2007) a montré pour 18 sujets exposés en milieu professionnel, que la mesure des composés perfluorés dans le sérum ou le plasma aboutissait à des résultats équivalents, ceci indépendamment du composé considéré (PFOA, PFOS ou PFHS) et des niveaux de concentration observés. De plus, le ratio entre les taux mesurés dans l'une ou l'autre de ces deux matrices par rapport aux taux mesurés dans le sang total est apparu proche de 2, suggérant que ces composés ne sont pas liés à la fraction cellulaire du sang.

Plusieurs de ces études font apparaître des disparités interindividuelles ou encore liées au sexe ou à l'âge. Deux des hypothèses avancées pour expliquer ces disparités sont une différence au niveau de l'expression de protéines porteuses d'anions organiques, et/ou de la résorption tubulaire rénale (Kudo et coll., 2002 ; Andersen et coll., 2006 ; Katakura et coll., 2007). Par ailleurs, Harada et coll. (2007) suggèrent que la demi-vie élevée des PFC chez l'homme pourrait également provenir d'une élimination biliaire prépondérante chez ce dernier, suivie d'un cycle entérohépatique très efficace. Cette hypothèse est corroborée par des analyses effectuées sur des prélèvements biliaires chez des sujets japonais montrant des concentrations médianes en

PFOS de 27,9 µg/l alors que les niveaux sériques médians sont de 23,2 µg/l (Harada et coll., 2007).

La revue d'Andersen et coll. (2008) reprend les discussions et les conclusions du séminaire « *Perfluoroalkyl Acids and Related Chemistries : Toxicokinetics and Modes-of-Action* » organisé en 2007 par la *Society of Toxicology Contemporary Concepts in Toxicology Symposium*, et soutenu par trois industries productrices de PFC ansi que par l'US EPA (14-16 février 2007, *Westin Arlington Gateway*, Arlington, VA). Leurs principales conclusions concernant la pharmacocinétique des PFC sont les suivantes :

- la compréhension des processus biologiques cinétiques et dose-dépendants qui impliquent des interactions probables entre les PFC et certains acides gras naturels à longue chaîne, notamment sur le plan de la compétition pour des protéines de liaison ou de transport, reste un défi ;
- un comportement pharmacocinétique non linéaire a été observé pour plusieurs PFC. Cette observation pourrait résulter de phénomènes de saturation et/ou d'induction de sites de liaison qui restent à caractériser ;
- l'utilisation de souris dépourvue de récepteurs PPARα pourrait permettre d'étudier ces phénomènes dose-dépendants liés à l'induction de nouvelles protéines et/ou à la liaison à des sites existants ;
- des études plus précises sont requises pour identifier quels transporteurs sont impliqués dans la distribution tissulaire et l'excrétion des PFC selon la taille de leur chaîne carbonée. L'inductibilité de ces transporteurs par les PFC reste également à étudier ;
- l'étude approfondie de la spécificité des PFC sur le plan de leur interaction avec les protéines porteuses et les récepteurs PPAR devrait permettre une meilleure compréhension du lien entre les niveaux d'imprégnation et les effets biologiques observés.

Au regard des importantes différences inter-espèces observées pour la durée de demi-vie des PFC, les études toxicocinétiques relatives à ces composés devraient systématiquement mentionner à la fois les doses journalières administrées et les concentrations tissulaires et/ou plasmatiques auxquelles les réponses biologiques sont observées.

En conclusion, au-delà d'une variabilité interindividuelle classiquement observée pour la mesure de tels polluants chimiques, la disparité de résultats rapportés pour certains PFC dont le PFOS, peut poser question. Une des hypothèses pour expliquer ce constat est l'existence de formes à la fois linéaires et ramifiées de certains composés, leur quantification soit distincte soit cumulée pouvant être l'option choisie ou adoptée sans connaissance de cause. La présence de composés interférents matriciels pouvant introduire une erreur de quantification de certains PFC est également un aspect déjà observé mais néanmoins non encore systématiquement évalué dans les différentes études publiées. Ces éléments sont à prendre en compte dans l'optique d'une évaluation du risque précise liée à ces composés.

L'exposition aux PFC estimée varie de quelques ng à quelques dizaines de ng/kg/j. Les valeurs estimées d'exposition aux PFC apparaissent en deçà des limites tolérées pour l'adulte en population générale, mais restent importantes pour des sous-populations particulièrement exposées (par exemple les forts consommateurs de poissons) et/ou à risque (fœtus, nourrisson…).

La présence de plusieurs représentants de cette classe de polluants chimiques dans certains fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum, les teneurs observées sont de l'ordre de quelques dizaines de µg/l.

Le PFOS et le PFOA apparaissent comme étant deux principaux biomarqueurs d'exposition aux PFC.

Une tendance séculaire à la diminution des niveaux d'imprégnation en population générale est observée aux États-Unis depuis 2002, date correspondant à l'arrêt de la production d'une des principales sociétés productrices. En revanche, l'absence de telles données concernant les autres pays ne permet pas de généraliser cette observation.

L'existence d'une exposition fœtale aux PFC est démontrée, plusieurs études ayant fait état d'un transfert mère-fœtus via le sang du cordon. Toutefois, les niveaux de concentration rapportés dans le sang du cordon sont systématiquement inférieurs aux teneurs observées dans le sang maternel (d'un facteur 1,5 à 3,5). L'existence d'une exposition du nourrisson allaité via le lait maternel est de même démontrée, même si cette voie de transfert de la mère à l'enfant apparaît plus limitée que pour d'autres classes de polluants organiques halogénés tels que les dioxines, les PCB, ou les retardateurs de flamme bromés.

Les demi-vies plasmatiques estimées pour le PFOS et le PFOA sont globalement de l'ordre de quelques heures chez le rongeur, quelques jours chez le primate et quelques années chez l'homme, ce qui en fait des polluants bioaccumulables mais moins persistants que d'autres substances plus lipophiles telles les dioxines ou les PCBs. Une élimination des PFC plus rapide chez la femelle a été montrée chez l'animal, cette différence intersexe étant toutefois moins sensible et significative chez l'Homme. Par ailleurs, une importante variabilité inter et intra-espèce est observée concernant les paramètres pharmacocinétiques de ces polluants. De même, une grande variabilité de ces paramètres est observée selon le composé considéré, et en particulier selon la longueur de chaîne carbonée, les composés à plus longue chaîne présentant un caractère plus persistant.

Un manque de données peut être constaté, pour les composés perfluorés autres que le PFOS et le PFOA chez l'homme, à tous les niveaux évoqués dans ce chapitre (exposition, imprégnation, métabolisme, pharmacocinétique). En particulier, les précurseurs de type fluorotélomères, ou encore polyfluoroalkyl phosphate surfactants (PAPS) récemment mentionnés dans la recommandation

2010/161/EU de la Commission Européenne[25] , sont des composés qui n'ont pas encore été étudiés sur le plan de l'évaluation du risque.

Bibliographie

ANDERSEN ME, CLEWELL III HJ, TAN YM, BUTENHOFF JL, OLSEN GW. Pharmacokinetic modeling of saturable, renal resorption of perfluoroalkylacids in monkeys—Probing the determinants of long plasma half-lives. *Toxicology* 2006, **227** : 156-164

ANDERSEN ME, BUTENHOFF JL, CHANG SC, FARRAR DG, KENNEDY GL JR, et coll. Perfluoroalkyl acids and related chemistries--toxicokinetics and modes of action. *Toxicol Sci* 2008, **102** : 3-14

ARSENAULT G, CHITTIM B, GU J, MCALEES A, MCCRINDLE R, ROBERTSON V. Separation and fluorine nuclear magnetic resonance spectroscopic (19F NMR) analysis of individual branched isomers present in technical perfluorooctanesulfonic acid (PFOS). *Chemosphere* 2008a, **73** : S53-S59

ARSENAULT G, CHITTIM B, MCALEES A, MCCRINDLE R, RIDDELL N, YEO B. Some issues relating to the use of perfluorooctanesulfonate (PFOS) samples as reference standards. *Chemosphere* 2008b, **70** : 616-625

AUSTIN ME, KASTURI BS, BARBER M, KANNAN K, MOHANKUMAR PS, MOHANKUMAR SM. Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1485-1489

BERNSMANN T, FÜRST P. Determination of perfluorinated compounds in human milk. *Organohalogen Compounds* 2008, **70** : 718-721

BURRIS JM, LUNDBERG JL, OLSEN GW, SIMPSON C, MANDEL J. Determination of serum half-lives of several fluorochemicals. Interim Report #2, 3M Medical Department, 2002

CALAFAT AM, WONG LY, KUKLENYIK Z, REIDY JA, NEEDHAM LL. Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population : data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1596-1602

CHU S, LETCHER RJ. Linear and branched perfluorooctane sulfonate isomers in technical product and environmental samples by in-port derivatization-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 2009, **81** : 4256-4262

CUI L, LIAO CY, ZHOU QF, XIA TM, YUN ZJ, JIANG GB. Excretion of PFOA and PFOS in male rats during a subchronic exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 2010, **58** : 205-213

EFSA. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Question No EFSA-Q-2004-163. *The EFSA Journal* 2008, **653** : 1-131

25. 2010/161/EU. Commission Recommendation on the monitoring of perfluoroalkylated substances in food. Official Journal, 17 March 2010

EGEGHY PP, LORBER M. An assessment of the exposure of Americans to perfluorooctane sulfonate : A comparison of estimated intake with values inferred from NHANES data. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010, 1-19 Feb 10. [Epub ahead of print]

EHRESMAN DJ, FROELICH JW, OLSEN GW, CHANG SC, BUTENHOFF JL. Comparison of whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals. *Environ Res* 2007, **103** : 176-184

ERICSON I, GOMEZ M, NADAL M, VAN BAVEL B, LINDSTROM G, DOMINGO JL. Perfluorinated chemicals in blood of residents in Catalonia (Spain) in relation to age and gender : a pilot study. *Environ Int* 2007, **33** : 616-623

FASANO WJ, CARPENTER SC, GANNON SA, SNOW TA, STADLER JC et coll. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of 8-2 fluorotelomer alcohol in the rat. *Toxicol Sci* 2006, **91** : 341-355. Erratum in : *Toxicol Sci* 2008, **102** : 455

FEI C, MCLAUGHLIN JK, TARONE RE, OLSEN J. Perfluorinated chemicals and fetal growth : a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1677-1682

FROMME H, KORNER W, SHAHIN N, WANNER A, ALBRECHT M et coll. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), as evidenced by data from a duplicate diet study, indoor air, house dust, and biomonitoring in Germany. *Environ Int* 2009, **35** : 1125-1135

HARADA K, INOUE K, MORIKAWA A, YOSHINAGA T, SAITO N, KOIZUMI A. Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* 2005, **99** : 253-261

HARADA K, KOIZUMI A, SAITO N, INOUE K, YOSHINAGA T, et coll. Historical and geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human serum in Japan. *Chemosphere* 2007, **66** : 293-301

HARADA KH, YANG HR, MOON CS, HUNG NN, HITOMI T, et coll. Levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in female serum samples from Japan in 2008, Korea in 1994-2008 and Vietnam in 2007-2008. *Chemosphere* 2010, **79** : 314-319

HAUG LS, THOMSEN C, BRANTSAETER AL, KVALEM HE, HAUGEN M, et coll. Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environ Int* 2010, **36** : 772-778

HEMAT H, WILHELM M, VOLKEL W, MOSCH C, FROMME H, WITTSIEPE J. Low serum levels of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS) in children and adults from Afghanistan. *Sci Total Environ* 2010, **408** : 3493-3495

HENDERSON WM, SMITH MA. Perfluorooctanoic acid and perfluorononanoic acid in fetal and neonatal mice following in utero exposure to 8-2 fluorotelomer alcohol. *Toxicol Sci* 2007, **95** : 452-461

HINDERLITER PM, MYLCHREEST E, GANNON SA, BUTENHOFF JL, KENNEDY GL JR. Perfluorooctanoate : Placental and lactational transport pharmacokinetics in rats. *Toxicology* 2005, **211** : 139-148

HÖLZER J, GOEN T, RAUCHFUSS K, KRAFT M, ANGERER J, et coll. One-year follow-up of perfluorinated compounds in plasma of German residents from Arnsberg formerly exposed to PFOA-contaminated drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 2009, **212** : 499-504

INOUE K, OKADA F, ITO R, KATO S, SASAKI S, et coll. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples : assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2004, **112** : 1204-1207

KÄRRMAN A, ERICSON I, VAN BAVEL B, DARNERUD PO, AUNE M, et coll. Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 226-230. Epub 2006 Nov 28.

KÄRRMAN A, DOMINGO JL, LLEBARIA X, NADAL M, BIGAS E, et coll. Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain : concentrations and trends in human liver and milk samples. *Environ Sci Pollut Res Int* 2010, **17** : 750-758

KATAKURA M, KUDO N, TSUDA T, HIBINO Y, MITSUMOTO A, KAWASHIMA Y. Rat organic anion transporter 3 and organic anion transporting polypeptide 1 mediate perfluorooctanoic acid transport. *J Health Sci* 2007, **53** : 77-83

KELLER JM, CALAFAT AM, KATO K, ELLEFSON ME, REAGEN WK, et coll. Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in human serum and milk standard reference materials. *Anal Bioanal Chem* 2010, **397** : 439-451

KUDO N, SUZUKI E, KATAKURA M, OHMORI K, NOSHIRO R, KAWASHIMA Y. Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chem Biol Interact* 2001, **134** : 203-216

KUDO N, KATAKURA M, SATO Y, KAWASHIMA Y. Sex hormoneregulated renal transport of perfluorooctanoic acid. *Chem Biol Interact* 2002, **139** : 301-316

KUDO N, IWASE Y, OKAYACHI H, YAMAKAWA Y, KAWASHIMA Y. Induction of hepatic peroxisome proliferation by 8-2 telomer alcohol feeding in mice: formation of perfluorooctanoic acid in the liver. *Toxicol Sci* 2005, **86** : 231-238

LIU J, LI J, ZHAO Y, WANG Y, ZHANG L, WU Y. The occurrence of perfluorinated alkyl compounds in human milk from different regions of China. *Environ Int* 2010, **36** : 433-438

LLORCA M, FARRE M, PICO Y, TEIJON ML, ALVAREZ JG, BARCELO D. Infant exposure of perfluorinated compounds: Levels in breast milk and commercial baby food. *Environ Int* 2010, **36** : 584-592

LUEBKER DJ, HANSEN KJ, BASS NM, BUTENHOFF JL, SEACAT AM. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* 2002, **176** : 1751-1785

MIDASCH O, SCHETTGEN T, ANGERER J. Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population. *Int J Hyg Environ Health* 2006, **209** : 489-496

MONROY R, MORRISON K, TEO K, ATKINSON S, KUBWABO C, STEWART B, FOSTER WG. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. *Environ Res* 2008, **108** : 56-62

NABB DL, SZOSTEK B, HIMMELSTEIN MW, MAWN MP, GARGAS ML, et coll. In vitro metabolism of 8-2 fluorotelomer alcohol: interspecies comparisons and metabolic pathway refinement. *Toxicol Sci* 2007, **100** : 333-344

NAKATA A, KATSUMATA T, IWASAKI Y, ITO R, SAITO K, et coll. Measurement of perfluorinated compounds in human milk and house dust. *Organohalogen Compounds* 2007, **69** : 2844-2846

NOKER PE, GORMAN GS. A pharmacokinetic study of potassium perfluorooctanesulfonate in the cynomolgus monkey. US. EPA docket AR-226–1356. Washington, DC : US Environmental Protection Agency, 2003

OLSEN GW, BURRIS JM, EHRESMAN DJ, FROEHLICH JW, SEACAT AM, et coll. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1298-1305

OLSEN GW, MAIR DC, CHURCH TR, ELLEFSON ME, REAGEN WK, et coll. Decline in perfluorooctanesulfonate and other polyfluoroalkyl chemicals in American Red Cross adult blood donors, 2000-2006. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 4989-4995

OLSEN GW, BUTENHOFF JL, ZOBEL LR. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development : an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 212-230

PISTOCCHI A, LOOS R. A Map of European Emissions and Concentrations of PFOS and PFOA. *Environ Sci Technol* 2009, **43** : 9237-9244

RIDDELL N, ARSENAULT G, BENSKIN JP, CHITTIM B, MARTIN JW, et coll. Branched perfluorooctane sulfonate isomer quantification and characterization in blood serum samples by HPLC/ESI-MS(/MS). *Environ Sci Technol* 2009, **43** : 7902-7908

ROOSENS L, D'HOLLANDER W, BERVOETS L, REYNDERS H, VAN CAMPENHOUT K, et coll. Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environ Pollut* 2010, **158** : 2546-2552

SEACAT AM, THOMFORD PJ, HANSEN KJ, OLSEN GW, CASE MT, BUTENHOFF JL. Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2002, **68** : 249-264

SEACAT AM, THOMFORD PJ, HANSEN KJ, CLEMEN LA, ELDRIDGE SR, et coll. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology* 2003, **183** : 117-131. Erratum in: *Toxicology* 2003, **192** : 263-264

SO MK, YAMASHITA N, TANIYASU S, JIANG Q, GIESY JP, et coll. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Technol* 2006, **40** : 2924-2929

STEENLAND K, JIN C, MACNEIL J, LALLY C, DUCATMAN A, et coll. Predictors of PFOA levels in a community surrounding a chemical plant. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 1083-1088

TAO L, MA J, KUNISUE T, LIBELO EL, TANABE S, KANNAN K. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 8597-8602

TAN YM, CLEWELL HJ 3RD, ANDERSEN ME. Time dependencies in perfluorooctylacids disposition in rat and monkeys: a kinetic analysis. *Toxicol Lett* 2008, **177** : 38-47

THIBODEAUX JR, HANSON RG, ROGERS JM, GREY BE, BARBEE BD, RICHARDS JH, BUTENHOFF JL, STEVENSON LA, LAU C. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I : maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* 2003, **74** : 369-381. Erratum in: *Toxicol Sci* 2004, **82** : 359

TOMS LM, CALAFAT AM, KATO K, THOMPSON J, HARDEN F, et coll. Polyfluoroalkyl chemicals in pooled blood serum from infants, children, and adults in Australia. *Environ Sci Technol* 2009, **43** : 4194-4199

TRUDEL D, HOROWITZ L, WORMUTH M, SCHERINGER M, COUSINS IT, HUNGERBUHLER K. Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal* 2008, **28** : 251-269

VANDEN HEUVEL JP, KUSLIKIS BI, VAN RAFELGHEM MJ, PETERSON RE. Disposition of perfluorodecanoic acid in male and female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991, **107** : 450-459

VÖLKEL W, GENZEL-BOROVICZÉNY O, DEMMELMAIR H, GEBAUER C, KOLETZKO B, et coll. Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk : results of a pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 2008, **211** : 40-46

XIE W, WU Q, KANIA-KORWEL I, THARAPPEL JC, TELU S, et coll. Subacute exposure to N-ethyl perfluorooctanesulfonamidoethanol results in the formation of perfluorooctanesulfonate and alters superoxide dismutase activity in female rats. *Arch Toxicol* 2009, **83** : 909-924

51
Études épidémiologiques

Les études épidémiologiques concernant les effets des perfluorés sur la fonction de reproduction sont peu nombreuses. Elles concernent essentiellement les taux d'hormones stéroïdes (trois études transversales, population générale et milieu professionnel) et les caractéristiques spermatiques (une étude transversale en population générale), la survenue d'incidents au cours de la grossesse, l'âge de la puberté (une étude) et la fécondité des couples (une cohorte). D'autres études se sont intéressées à diverses pathologies non liées directement à la reproduction.

Effets sur la fonction de reproduction masculine

Hormones gonadotropes, gonadiques et thyroïdiennes

Une étude transversale a été réalisée au Danemark auprès de 105 hommes jeunes (18 à 25 ans) de la population générale (Joensen et coll., 2009). Ces sujets constituaient un sous-groupe des participants à l'étude sur la fertilité des conscrits réalisée au Danemark et dans d'autres pays du nord de l'Europe depuis 1996 (Jorgensen et coll., 2006). Parmi les 546 hommes examinés en 2003 à Copenhague dans le cadre de cette étude, les auteurs ont sélectionné les 53 et 52 sujets présentant la concentration de testostérone la plus élevée ou la plus faible, respectivement. Un échantillon de sérum a été prélevé le même jour que celui du recueil de sperme, puis a été congelé. En 2008, un dosage de 10 composés perfluorés, dont le PFOA (médiane, 24,5 µg/l) et le PFOS (médiane, 4,9 µg/l) a été réalisé dans ces échantillons de sérum. La corrélation entre les concentrations de PFOA et PFOS était de 0,59 ($p<0,01$). Les associations entre les concentrations de biomarqueurs et les concentrations hormonales ont été quantifiées à l'aide de modèles de régression ajustées sur l'heure de la prise de sang, en codant les hormones en continu (généralement après une transformation logarithmique), et aussi en utilisant un score en catégories dépendant des valeurs des concentrations en PFOS et PFOA simultanément.

La concentration de PFOS n'était pas nettement associée aux hormones reproductives considérées. Les tendances les plus nettes avec le PFOS étaient

observées pour le FAI (*Free Androgen Index*), qui avait tendance à diminuer avec le PFOS. Le PFOA n'était pas non plus associé nettement aux concentrations hormonales. Dans une analyse supplémentaire, les auteurs ont additionné les concentrations massiques de PFOA et PFOS, et ont caractérisé l'association entre cette somme (notée PFAA) et les mêmes hormones reproductives. L'association la plus nette était observée avec le *Free Androgen Index* (FAI) : le logarithme de cet indice diminuait de 0,006 (IC 95 % : -0,001 à 0,014) pour une augmentation de 1 µg/l des PFAA. Les auteurs insistent également sur la tendance à la diminution du ratio inhibine B/FSH avec la concentration de PFAA (-0,006 ; IC 95% : -0,034 à 0,022). L'ensemble des résultats sont présentés dans le tableau 51.I. Les auteurs n'ont pas non plus trouvé de différences des concentrations de PFOS ou PFOA entre le groupe de sujets avec une concentration de testostérone faible et le groupe avec une concentration de testostérone élevée.

Cette étude est limitée par une taille relativement faible (mais c'est la première sur cette question) et par son caractère transversal (ce qui est une approche fréquente pour une question nouvelle). De plus, l'échantillonnage stratifié sur le niveau de testostérone, qui n'a pas été pris en compte dans l'analyse statistique, est susceptible d'avoir biaisé les résultats dans un sens difficilement prévisible. Ces limites font qu'on ne peut pas considérer que ce travail apporte des éléments forts en faveur d'une absence d'effet à court terme des PFOA et PFOS à l'âge adulte sur les hormones reproductives chez l'homme.

Tableau 51.I : Variations (et IC 95 %) des concentrations d'hormones de la reproduction chez 105 hommes jeunes danois en relation avec les variations de concentration du PFOS, PFOA et de la somme des deux composés (PFAA) (Joensen et coll., 2009)

Hormones[a]	PFOS[b]	PFOA[b]	PFAA[b]
Testostérone	-0,087 [-0,32-0,15]	-0,98 [-2,33-0,37]	-0,093 [-0,303-0,116]
Ln[c] Œstradiol	-0,01 [-0,008-0,005]	-0,012 [-0,051-0,027]	-0,001 [-0,007-0,005]
Ln SHBG	0,002 [-0,007-0,012]	-0,009 [-0,067-0,048]	0,002 [-0,007-0,011]
Ln LH	0,000 [-0,014-0,012]	-0,010 [-0,084-0,064]	0,000 [-0,012-0,010]
Ln FSH	0,004 [-0,13-0,22]	-0,037 [-0,14-0,064]	0,003 [-0,013-0,018]
Ln inhibine B	-0,004 [-0,21-0,12]	0,012 [-0,084-0,11]	-0,003 [-0,018-0,012]
Ln FAI	-0,006 [-0,015-0,002]	-0,038 [-0,087-0,011]	-0,006 [-0,014-0,001]
Ln Testostérone/LH	-0,003 [-0,017-0,011]	-0,037 [-0,12-0,045]	-0,003 [-0,016-0,009]
Ln FAI/LH	-0,006 [-0,020-0,009]	-0,028 [-0114-0,058]	-0,005 [-0,018-0,008]
Ln Œstradiol/testostérone	-0,003 [-0,005-0,010]	0,035 [-0,010-0,081]	0,003 [-0,004-0,010]
Ln Inhibine/FSH	-0,009 [-0,039-0,022]	0,049 [-0,13-0,23]	-0,006 [-0,034-0,022]

[a] Les taux d'hormones sont ajustés par rapport à l'heure de prélèvement ; [b] Les variations sont données pour une augmentation de 1 µg/l de la concentration du composé perfluoré considéré ; [c] Ln : logarithme népérien

Les deux études transversales d'Olsen et coll. (1998) conduites auprès de 111 et 88 sujets exposés en milieu professionnel n'indiquaient pas de lien net entre les niveaux d'imprégnation au PFOA et les taux sériques des principales hormones stéroïdes sexuelles. L'analyse statistique (donnant les niveaux moyens de PFOA en fonction des dosages hormonaux) ne permet pas une confrontation aisée de ces résultats avec ceux de l'étude de Joensen et coll. (2009).

Caractéristiques spermatiques

L'étude de Joensen et coll. (2009) a également caractérisé l'association entre les niveaux de PFOS et PFOA d'un côté, et les caractéristiques spermatiques de l'autre. Comme pour les hormones reproductives, les auteurs ont examiné séparément l'association entre chaque caractéristique spermatique (log-transformée, sauf pour la morphologie, correspondant à la proportion de spermatozoïdes avec une morphologie considérée typique) et la concentration massique de PFOS, de PFOA, de leur somme (notée PFAA) et du score des PFAA. Les analyses sur la concentration ont été ajustées sur la durée d'abstinence sexuelle avant le recueil spermatique.

Les résultats (tableau 51.II) n'indiquent pas d'association statistiquement nette avec le PFOS ; toutefois la concentration spermatique tendait à diminuer avec la concentration de PFOS (diminution de 0,020 du log de la concentration spermatique pour toute augmentation de 1 µg/l de la concentration de PFOS, IC 95 % [-0,005 - +0,044], et il en allait de même pour la mobilité spermatique et la morphologie spermatique. La situation était similaire pour le PFOA et la somme des concentrations massiques des deux composés : tendances à la diminution de la concentration, mobilité et morphologie spermatiques, sans qu'aucune des associations soit nette statistiquement. Quand on considérait le score d'exposition aux PFAA, l'association la plus nette était observée pour la proportion de spermatozoïdes avec une morphologie normale, qui avait tendance à diminuer avec le score d'exposition combinée au PFOA et PFOS (p=0,04), et le nombre total de spermatozoïdes morphologiquement normaux (produit de la concentration spermatique par la proportion de spermatozoïdes morphologiquement normaux, p=0,03).

Les limites de cette analyse sont les mêmes que celles de l'analyse sur les hormones reproductives fondée sur la même population indiquée plus haut. L'effet possible des PFOA et PFOS sur la proportion et le nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux rapporté ici doit donc être considéré avec prudence à ce stade.

Tableau 51.II : Variations (et IC 95 %) des caractéristiques spermatiques chez 105 hommes jeunes danois en relation avec les variations des concentrations de PFOS, PFOA et de la somme des deux composés (PFAA) (µg/l) (Joensen et coll., 2009)

Variables[a]	PFOS[b]	PFOA[b]	PFAA[b]
Ln[c] volume de liquide séminal	0,00 [-0,012-0,011]	-0,002 [-0,070-0,066]	0,000 [-0,010-0,010]
Ln concentration de spermatozoïdes	-0,020 [-0,044-0,005]	-0,080 [-0,230-0,066]	-0,018 [-0,040-0,004]
Ln compte total de spermatozoïdes	-0,018 [-0,045-0,010]	-0,074 [-0,230-0,086]	-0,016 [-0,041-0,008]
Ln mobilité	-0,006 [-0,19-0,007]	-0,027 [-0,110-0,053]	-0,006 [-0,018-0,007]
Morphologie	-0,085 [-0,200-0,026]	-0,540 [-1,200-0,110]	-0,082 [-0,0181-0,018]

[a] Le volume, la concentration et le compte total ont été ajustés sur la durée d'abstinence ; la mobilité a été ajustée sur le temps entre l'éjaculation et l'analyse du sperme ; la morphologie n'a pas été ajustée sur les facteurs de confusion ; [b] Les variations sont données pour une augmentation de 1 µg/l de la concentration du composé perfluoré considéré ; [c] Ln : logarithme népérien

Effets sur la fonction de reproduction féminine

Effets sur la survie fœtale/survenue de fausse-couche spontanée

Le C8 *Health Project*[26] a permis d'étudier l'association entre les niveaux de PFOS et PFOA chez la femme et différentes issues et troubles de grossesse (Stein et coll., 2009). Ce projet a été mené dans le cadre d'une action collective en justice de résidents des états de West Virginia et Ohio (États-Unis) vivant à proximité d'une usine ayant utilisé du PFOA à partir de 1951 pour synthétiser des polymères fluorés. La contamination de l'eau de boisson et la déposition de l'air contaminé sont les deux principales voies d'exposition supposées de cette population, dont les niveaux sériques de PFOA (médiane, 21 µg/l) sont élevés par rapport à la population générale, alors que ceux de PFOS (médiane, 14 µg/l) sont plus habituels, voire faibles par rapport à la population de femmes enceintes danoises étudiée par Fei et coll. (2009). Le protocole s'est appuyé sur un échantillonnage transversal de la population de six districts dont l'eau avait été contaminée par les rejets de l'usine, qui a répondu à un questionnaire de santé en 2005-2006 (taux de participation proche de 80 %) et a accepté un prélèvement de sang, qui a permis le dosage sérique de plusieurs composés perfluorés. La population de l'analyse concernant les PFOA a de plus été restreinte aux grossesses pour lesquelles la femme n'avait pas déménagé entre le début de la grossesse et la date du dosage des composés perfluorés, pour rendre les dosages sériques à l'inclusion dans l'étude

26. http://www.c8sciencepanel.org/

plus représentatifs des niveaux durant la grossesse. Les auteurs ont caractérisé l'association entre les concentrations sériques de composés perfluorés et les issues des grossesses des 5 années précédant le prélèvement de sang. Ont été étudiées en particulier la survenue de fausse-couche spontanée, de prééclampsie (pathologie de la grossesse consistant en une hypertension et la présence de protéines dans les urines) et le poids de naissance des enfants (non détaillé ici) ainsi que les risques de malformation congénitale et de naissance prématurée (non détaillé ici). Les concentrations de PFOA et PFOS n'étaient que faiblement corrélées entre elles ($r=0,2$, $p<0,001$).

Les résultats n'indiquaient pas d'association entre les concentrations de PFOA et le risque de fausse-couche spontanée. Concernant le risque de prééclampsie, les analyses ont mis en évidence une augmentation du risque de prééclampsie en association avec les niveaux de PFOS. Le risque de prééclampsie tendait également à augmenter avec les concentrations de PFOA mais l'association était moins nette sur le plan statistique.

La limite principale de l'étude est due à son caractère rétrospectif, qui a des conséquences tant sur l'estimation de l'exposition (les niveaux d'exposition ont probablement varié dans une certaine mesure entre la grossesse considérée et le moment du dosage), sur les facteurs de confusion pris en compte (la consommation de tabac lors du recrutement, mais pas lors de la grossesse, était disponible) et sur la qualité de la mesure des événements de santé considérés.

Survenue de la puberté

Des résultats préliminaires ont été diffusés sur l'association entre PFOS, PFOA et survenue de la puberté. Lopez-Espinosa et coll. (2001) se sont intéressés à la survenue de la puberté en relation avec l'exposition aux composés perfluorés (PFOS et PFOA). L'analyse reposait sur la population de l'étude C8 (Survie fœtale). Le statut pubertaire était estimé à partir de dosages hormonaux (testostérone pour les garçons, œstradiol chez les filles). Les résultats indiquaient une diminution de la probabilité d'être pubère en association avec la concentration sérique de PFOS chez le garçon et la fille ; une association similaire était observée avec le PFOA, mais chez les filles seulement. Le caractère transversal de l'étude ne permet pas d'écarter un biais de causalité inverse.

Effets sur la fertilité du couple

Dans une étude réalisée auprès de 1 240 couples de la cohorte de naissance danoise (*Danish National Birth Cohort*), recrutés entre 1996 et 2002, les concentrations plasmatiques de PFOS et PFOA ont été mesurées à partir de

prélèvements effectués entre 4 et 14 semaines de grossesse (Fei et coll., 2009). Les couples ont été catégorisés en quatre groupes de taille équivalente (ou quartiles) en fonction des concentrations de PFOS et PFOA. Ces femmes correspondent à un échantillon aléatoire de sujets de la *Danish National Birth Cohort*, d'où les couples déclarant que la grossesse n'avait pas été planifiée avaient été exclus. Un questionnaire renseigné durant le premier trimestre de grossesse par la femme a permis de quantifier le délai nécessaire pour concevoir, qui a été censuré statistiquement au-delà de 13 mois dans les analyses, comme il est préconisé pour s'affranchir des biais liés aux traitements médicaux de l'infertilité. Dans les analyses non ajustées, les concentrations moyennes de PFOA et PFOS avaient tendance à augmenter avec le délai nécessaire pour concevoir. Après ajustement sur différents facteurs susceptibles d'être associés à la fertilité, et notamment la corpulence de la femme, les caractéristiques socio-économiques du couple, la consommation d'alcool de la femme, le risque d'infécondité involontaire de plus de 12 mois augmentait avec la concentration de PFOS ; en prenant comme référence le quartile correspondant aux 25 % de sujets les moins exposés, le risque (*odds-ratio*) d'infécondité involontaire de plus de 12 mois était de 1,7 dans le second quartile (IC 95 % : 1,0-2,9), de 2,3 (IC 95 % : 1,4-3,9) dans le troisième quartile et de 1,8 (IC 95 % : 1,1-3,0) dans le quatrième quartile, correspondant à l'exposition la plus élevée (test de tendance, p=0,03). Dans une analyse à l'aide d'un modèle de survie prenant en compte l'ensemble des variations dans le délai nécessaire pour concevoir, la probabilité de grossesse par cycle menstruel (fécondabilité) diminuait avec l'exposition au PFOS. Des résultats similaires étaient observés dans les analyses considérant le PFOA : augmentation de la fréquence d'infécondité involontaire de plus de 12 mois (test de tendance, p=0,006 ; *odds-ratio* d'infécondité involontaire de plus de 12 mois associé au quartile d'exposition le plus élevé, 2,5 (IC 95% : 1,5-4,4), par rapport au premier quartile), et diminution de la fécondabilité (*odds-ratio* de fécondabilité associé au quartile le plus élevé, 0,6 (IC 95 % : 0,5-0,8)).

Par ailleurs, les auteurs (Fei et coll., 2009) rapportent que, dans des analyses non ajustées, les concentrations de PFOA et PFOS étaient associées à une fréquence plus élevée de cycles menstruels irréguliers, mais ces résultats doivent être considérés comme très préliminaires étant donné qu'aucune analyse statistique détaillée ne semble avoir été effectuée.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec des approches adaptées et les associations très nettes entre les concentrations plasmatiques sont peu susceptibles d'être expliquées par un biais lié à la qualité de la mémorisation du délai pour obtenir la grossesse. De même, une analyse supplémentaire des auteurs indique que l'exclusion des couples n'ayant pas planifié leur grossesse n'est pas susceptible d'entraîner des associations statistiques dans le sens de celles observées. Une limite méthodologique de l'étude concerne l'estimation de l'exposition ; les auteurs ont dosé les concentrations de composés perfluorés en début de grossesse, c'est-à-dire ultérieurement à la période de recherche de

grossesse, qui correspond à une fenêtre d'exposition biologiquement plus pertinente, comme les auteurs le rappellent. Le délai entre le début de cette période et le moment du prélèvement sanguin (en début de grossesse) était d'autant plus long que le délai pour concevoir était long. Ceci est susceptible d'avoir induit des erreurs de classement dans l'exposition ; la direction et l'amplitude d'un biais dans l'association entre exposition et risque d'infertilité qui aurait pu en découler ne sont pas faciles à prévoir ; la nature assez persistante des composés testés peut toutefois laisser penser que ce problème lié à la fenêtre d'exposition n'a pas entraîné de biais majeur. En termes de biais de confusion potentiels, les auteurs ont pris en compte plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la fertilité des couples ; ils n'ont pas ajusté sur la consommation de tabac, pour laquelle seule l'information concernant le tabagisme durant (et non pas avant) la grossesse était disponible. Une analyse supplémentaire prenant en compte le tabagisme durant la grossesse n'entraînait pas de modification des résultats, pas plus qu'un ajustement sur l'activité professionnelle du partenaire masculin. Un ajustement sur la régularité du cycle menstruel ne modifiait pas non plus les résultats. Il faudrait connaître plus précisément les sources et situations d'exposition au PFOS et PFOA pour discuter de la plausibilité de l'existence d'autres facteurs de confusion potentiels non pris en compte, qui seraient associés simultanément à l'exposition et à des troubles de fertilité.

Comme c'est souvent le cas quand on s'intéresse à un marqueur global tel que la fertilité du couple, l'étude ne permettait pas de préciser les mécanismes biologiques par lesquels le PFOS et le PFOA pourraient influencer la fertilité ; dans la mesure où les expositions des deux partenaires d'un couple sont susceptibles d'être corrélées, on ne peut pas déterminer avec assurance si l'effet éventuel passe par un effet du côté féminin et/ou masculin, ni quelle(s) étape(s) ou paramètre(s) de la fonction de reproduction est (sont) potentiellement atteinte(s), des caractéristiques des ovocytes à la fonction sexuelle, la fertilisation, jusqu'aux premières phases du développement intra-utérin, avant la détection de la grossesse.

Autres effets en marge du domaine couvert par la présente expertise

Effets sur le développement fœtal

Plusieurs études ont cherché à caractériser l'association entre les concentrations sériques de PFOS ou PFOA et un marqueur de la croissance fœtale (en général, taille ou poids du nouveau-né corrigé sur la durée de la gestation). Bien que la croissance fœtale ne fasse pas partie du champ initial de la présente expertise, ce point mérite une attention particulière car il s'agit d'un des premiers événements de santé étudié chez l'homme, à la suite de travaux

chez l'animal, et donc un des événements pour lesquels la littérature humaine est la moins parcellaire.

Au moins deux revues, reprenant notamment les études sur la croissance fœtale, ont été publiées. La revue épidémiologique réalisée par le département de médecine de la compagnie 3M, ayant produit des composés perfluorés (Olsen et coll., 2009) a revu cinq études en population générale publiées avant 2008 et reposant sur un dosage sérique des composés perfluorés mis en relation avec le poids de naissance, ainsi que deux études en milieu professionnel sans dosage des expositions. Les auteurs considéraient que les études en population générale ont fourni des résultats peu cohérents dans l'ensemble concernant un effet éventuel du PFOS et/ou du PFOA sur le poids, la taille ou le périmètre crânien à la naissance. Par ailleurs, dans son rapport de 2008, le panel Contam de l'EFSA[27] estime que les études épidémiologiques disponibles n'indiquent pas de façon évidente d'associations positives entre les niveaux d'imprégnation au PFOS ou au PFOA et le poids de naissance ou l'âge gestationnel. Enfin, la revue plus récente de Steenland et coll. (2010) conclut, à partir de sept études ayant rapporté une association entre PFOS ou PFOA considéré de façon continue, et le poids de naissance considéré aussi de façon continue, que ces études suggèrent, mais de façon non cohérente (« *inconsistent* »), une diminution possible du poids de naissance en association avec la concentration sérique de PFOA ; concernant le PFOS, certaines études rapportaient un effet du PFOS similaire, plus fort ou plus faible sur le poids de naissance que pour le PFOA (Steenland et coll., 2010).

Nous discutons ci-dessous cette littérature sur la croissance fœtale, sans reprendre les études avec un effectif très faible (par exemple l'étude d'Inoue et coll (2004), reposant sur 15 nouveau-nés), et en insistant sur les études ayant analysé le poids de naissance de façon continue, pour lesquelles une mise en parallèle de plusieurs études de taille et méthodologie satisfaisantes est possible. Les études concernant l'analyse du petit poids de naissance (<2 500 g) considéré de façon binaire requièrent des effectifs importants et ne seront pas discutées (par exemple, Fei et coll., 2007 ; Stein et coll., 2009).

Les études de cohorte ayant un effectif supérieur à 100 naissances et avec un dosage des composés perfluorés à partir d'un prélèvement biologique (généralement durant la grossesse) et ayant étudié le poids de naissance ajusté sur la durée de gestation sont résumées dans le tableau 51.III pour le PFOS et dans le tableau 51.IV pour le PFOA. L'étude de Monroy et coll. (2008) dont l'effectif était de 101 naissances et qui n'a rapporté que des corrélations non ajustées entre l'exposition et le poids de naissance n'a pas été prise en compte ici. Les auteurs mentionnent que l'analyse ajustée n'a pas produit d'association significative, sans rapporter le paramètre correspondant. Pour la même raison, l'étude de So et coll. (2006) portant sur 19 enfants n'a pas été rapportée.

27. http://www.efsa.europa.eu/EFSA

Tableau 51.III : Synthèse des études épidémiologiques d'effectif supérieur à 100 naissances ayant rapporté l'association entre la concentration sérique de PFOS et le poids de naissance considéré en continu

Étude	Unité (PFOS)	n	Effet sur le poids de naissance		Effet sur le périmètre crânien	
			β	IC 95 %	β	IC 95 %
Apelberg et coll., 2007	µg/l (log-transformé)	293	-69	[-149-10]	-0,32	[-0,56--0,07]
Fei et coll., 2007	µg/l	1 400	-0,46	[-2,34-1,41]		
Washino et coll., 2009	µg/l (log_{10}-transformé)	428	-149	[-297-1]	-0,20	[-0,78-0,37]
Hamm et coll., 2010	µg/l (log-transformé)	252	31	[-43-106]		

β représente la variation du paramètre considéré associé à l'augmentation d'une unité de PFOS (log transformé ou non)

Les travaux concernant les effets possibles du PFOS dosé dans un prélèvement biologique et considéré de façon continue (avec ou sans transformation logarithmique) sur le poids de naissance ajusté sur la durée de gestation et analysé aussi en continu, sont résumés (tableau 51.III). Trois des quatre études rapportent une tendance à la diminution du poids de naissance avec la concentration sérique de PFOS, alors qu'une étude (Hamm et coll., 2009) rapporte une tendance non significative.

Dans le cas du PFOA (tableau 51.IV), les quatre études rapportent une tendance à la diminution du poids de naissance avec la concentration sérique de PFOA, l'association n'étant statistiquement significative que pour l'étude ayant le plus grand effectif, qui s'appuie sur 1 400 paires mère-enfant de la *Danish National Birth Cohort* (Fei et coll., 2007). Constatant que les associations vont toutes dans la même direction pour toutes les études (ici, une diminution du poids de naissance avec l'exposition), nous pouvons considérer que ces quatre études apportent des résultats relativement cohérents. Des tests statistiques d'hétérogénéité permettraient de quantifier plus précisément l'homogénéité de ces résultats.

Tableau 51.IV : Synthèse des études épidémiologiques d'effectif supérieur à 100 naissances ayant rapporté l'association entre la concentration sérique de PFOA et le poids de naissance considéré en continu

Étude	Unité (PFOA)	n	Effet sur le poids de naissance		Effet sur le périmètre crânien	
			β	IC 95 %	β	IC 95 %
Fei et coll., 2007	µg/l	1 400	-11	[-21--1]		
Apelberg et coll., 2007	µg/l (log_e-transformé)	293	-104	[-213-05]	-0,32	[-0,56--0,]
Washino et coll., 2009	µg/l (log_{10}-transformé)	428	-75	[-192-42]	-0,05	[-0,50-0,40]
Hamm et coll., 2009	µg/l (log_e-transformé)	252	-37	[-86-11]		

β représente la variation du paramètre considéré associé à l'augmentation d'une unité de PFOA (log transformé ou non).

L'étude de Stein et coll. (2009) réalisée à partir du C8 *project* indiqué plus haut a, toujours dans la même population, étudié l'association entre PFOA, PFOS et la proportion de nouveau-nés avec un petit poids de naissance (inférieur à 2 500 g). Il n'y avait pas de relation dose-effet strictement monotone entre la concentration de PFOA et le risque de petit poids de naissance.

Autres événements de santé considérés

L'étude épidémiologique de Lundin et coll. (2009) n'a pas observé d'association entre une exposition professionnelle au PFOA et la prévalence de cancer du foie, du pancréas ou des testicules (avec un effectif ne permettant pas d'étudier un événement ayant la fréquence du cancer de façon satisfaisante), mais en revanche a fait état d'une association avec le cancer de la prostate, les maladies cérébro-vasculaires et le diabète (n=3 993 sujets).

L'étude de Steenland et coll. (2009) conduite chez des sujets (n=46 494) exposés essentiellement via l'eau de boisson produite dans une zone particulièrement contaminée, a montré une association positive entre les niveaux d'imprégnation au PFOS et au PFOA et les teneurs des principaux types de lipides (cholestérol, LDL, triglycérides, mais pas HDL).

En conclusion, le nombre d'études concernant les effets potentiels du PFOA et du PFOS sur la fonction de reproduction humaine est encore très limité. Excepté le poids de naissance (qui n'est pas dans le champ de cette expertise), chaque événement de la fonction de reproduction n'a pas été caractérisé dans plus d'une étude. Comme c'est souvent le cas pour les premières études s'attachant à caractériser l'impact potentiel d'un composé qui constitue une préoccupation récente, celles-ci sont souvent de nature transversale, c'est-à-dire avec un dosage simultané des composés chimiques et des paramètres biologiques ou événements de santé d'intérêt ; cette approche, très fréquente, est a priori plus sujette à des biais qu'une approche prospective. Cette limite est toutefois moins préoccupante dans le cas du PFOA et du PFOS, dont la demi-vie dans l'organisme est de plusieurs années, que pour d'autres composés moins persistants.

Les études réalisées ont rapporté un effet possible des composés perfluorés (sans pouvoir l'attribuer spécifiquement au PFOS ou au PFOA) sur la fertilité des couples (augmentation du risque d'infécondité involontaire). Un effet sur la morphologie spermatique a été suggéré dans une unique étude humaine et appelle à de nouveaux travaux reposant sur une approche longitudinale. Pour les autres événements de santé faisant partie du champ de cette expertise, les études sont trop limitées pour indiquer un effet possible des composés perfluorés. Par ailleurs, un effet du PFOA sur le poids de naissance (ajusté sur l'âge gestationnel) peut être considéré comme plausible, à partir d'un petit nombre d'études de cohortes de taille et méthodologie satisfaisantes.

Bibliographie

APELBERG BJ, WITTER FR, HERBSTMAN JB, CALAFAT AM, HALDEN RU, et coll. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1670-1676

EFSA. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Question No EFSA-Q-2004-163. *The EFSA Journal* 2008, **653** : 1-131

FEI C, MCLAUGHLIN JK, TARONE RE, OLSEN J. Perfluorinated chemicals and fetal growth : a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 2007, **115** : 1677-1682

FEI C, MCLAUGHLIN JK, LIPWORTH L, OLSEN J. Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod* 2009, **24** : 1200-1205

HAMM MP, CHERRY NM, CHAN E, MARTIN JW, BURSTYN I. Maternal exposure to perfluorinated acids and fetal growth. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010, **20** : 589-597

INOUE K, OKADA F, ITO R, KATO S, SASAKI S, et coll. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples : assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2004, **112** : 1204-1207

JOENSEN UN, BOSSI R, LEFFERS H, JENSEN AA, SKAKKEBAEK NE, JORGENSEN N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 923-927

JØRGENSEN N, ASKLUND C, CARLSEN E, SKAKKEBAEK NE. Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. *Int J Androl* 2006, **29** : 54-61

LOPEZ-ESPINOSA M-J, FLETCHER T, ARMSTRONG B, GENSER B, DHATARIYA K, et coll. Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) with age of puberty among children living near a chemical plant *Environ Sci Technol* 2011 dx.doi.org/10.1021/es1038694

LUNDIN JI, ALEXANDER BH, OLSEN GW, CHURCH TR. Ammonium perfluorooctanoate production and occupational mortality. *Epidemiology* 2009, **20** : 921-928

MONROY R, MORRISON K, TEO K, ATKINSON S, KUBWABO C, et coll. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. *Environ Res* 2008, **108** : 56-62

OLSEN GW, GILLILAND FD, BURLEW MM, BURRIS JM, MANDEL JS, MANDEL JH. An epidemiologic investigation of reproductive hormones in men with occupational exposure to perfluorooctanoic acid. *J Occup Environ Med* 1998, **40** : 614-622

OLSEN GW, BUTENHOFF JL, ZOBEL LR. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development : an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 212-230

SO MK, YAMASHITA N, TANIYASU S, JIANG Q, GIESY JP, et coll. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Technol* 2006, **40** : 2 924-299

STEENLAND K, TINKER S, FRISBEE S, DUCATMAN A, VACCARINO V. Association of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate with serum lipids among adults living near a chemical plant. *Am J Epidemiol* 2009, **170** : 1268-1278

STEENLAND K, FLETCHER T, SAVITZ DA. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 1100-1108

STEIN CR, SAVITZ DA, DOUGAN M. Serum levels of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 2009, **170** : 837-846

WASHINO N, SAIJO Y, SASAKI S, KATO S, BAN S, et coll. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009, **117** : 660-667

52
Études chez l'animal

Les études toxicologiques se sont intéressées principalement aux effets des composés perfluorés sur la fertilité et le développement fœtal. Des études *in vitro* et *in vivo* ont également analysé la production d'androgènes testiculaires et la stéroïdogenèse ovarienne.

Étude sur plusieurs générations

Butenhoff et coll. (2004) et York et coll. (2010) ont étudié les effets du PFOA sur des rats Sprague-Dawley sur deux générations. Des doses de 1, 3, 10 et 30 mg/kg/j d'ammonium perfluorooctanoate ont été administrées à des rats de 6 semaines par voie orale pendant 70 jours. Trente rats sont utilisés pour chaque dose. Les auteurs n'ont observé aucun effet sur la fertilité des animaux en première ou seconde génération. Une baisse du poids corporel a été notée dès la dose de 3 mg/kg et une augmentation du poids du foie à toutes les doses (pour les mâles). Les analyses histologiques pratiquées sur les testicules, épididyme, prostate et vésicules séminales n'ont pas révélé de défaut morphologique. Seule une légère baisse du poids de la prostate a été notée à la dose de 30 mg/kg. Le nombre, la morphologie ou la mobilité des spermatozoïdes ne présentent aucune altération quelle que soit la dose. Un point important à relever est que les auteurs ont mesuré le taux de PFOA sérique ; celui-ci passe de 34 µg/ml chez les rats témoins à 51 500 et 45 300 µg/ml chez les rats mâles traités respectivement avec 10 et 30 mg/kg. Ces études indiquent donc que même à de très fortes doses le PFOA ne modifie pas la fertilité des rats mâles.

Le même groupe (Butenhoff et coll., 2009) a étudié les effets du PFHxS administré à des doses de 0,3, 1, 3 et 10 mg/kg/j à des groupes de 15 rats pendant 40 jours. Les taux sériques et hépatiques ont été mesurés. Le taux de PFHxS sérique passe de 0,4 µg/ml à 18 et 183 µg/ml, respectivement pour les doses de 0,3 et 10 mg/kg chez les rats mâles. Aucun effet du PFHxS n'est observé sur la fertilité, le nombre ou la mobilité des spermatozoïdes quelle que soit la dose. À nouveau, une hypertrophie hépatique est rapportée chez les mâles, ce dès la dose de 3 mg/kg. Notons que dans cette étude la durée du traitement est inférieure à un cycle de spermatogenèse complet. Par ailleurs, les taux sériques et hépatiques des rats témoins sont largement plus élevés que ceux observés chez l'être humain. Cependant, le PFHxS ne semble pas altérer

la fertilité des rats mâles même à des doses 30 000 fois plus fortes que les doses mesurées chez l'être humain.

Effets sur le développement fœtal

Le groupe de Butenhoff a étudié les effets du PFOA (Butenhoff et coll., 2004), du PFHxS (Butenhoff et coll., 2009) et du PFOS (Chang et coll., 2009) chez le rat Sprague-Dawley pendant la gestation. En dépit de durée de gavage variable, les auteurs n'observent que très peu d'effets sur la survie fœtale. Seule une augmentation de la mortalité postnatale est notée pour de fortes doses de PFOA (30 mg/kg/j). À cette même dose, une augmentation de l'âge de l'ouverture vaginale et de la séparation du prépuce est également rapportée chez les femelles et les mâles respectivement. Notons à nouveau que le rat femelle n'est peut-être pas le meilleur modèle pour l'étude des PFC du fait de l'élimination rapide de ces composés.

Chez la souris CD1, deux études (Lau et coll., 2006 ; Wolf et coll., 2007) ont analysé les effets d'un gavage avec des doses de 1 à 40 mg/kg/j du premier au 17e jour de gestation. L'intérêt majeur de l'étude de Wolf et coll. est de démontrer un effet du traitement pendant la gestation séparable de l'effet dû au transfert pendant la lactation grâce à des expériences d'adoption. Cet effet est une diminution du poids corporel liée au traitement *in utero* à la dose de 5 mg/kg/j de PFOA. Cette étude rapporte en outre un transfert *in utero* efficace puisque des taux importants de PFOA sont retrouvés dans le sérum des animaux traités *in utero* à 22 jours postnatals (de l'ordre de 9 à 22 µg/ml). L'étude de Lau et coll. (2006) rapporte une augmentation de la mortalité postnatale aux fortes doses (à partir de 10 mg/kg/j) et une diminution du nombre de petits par portée (dès 20 mg/kg/j). À ces fortes doses, la maturité sexuelle des femelles traitées *in utero* est retardée : l'âge de l'ouverture vaginale et celui du premier œstrus sont augmentés. Chez le mâle, les auteurs rapportent au contraire une diminution de l'âge auquel le prépuce se sépare dès la dose de 1 mg/kg/j. La séparation du prépuce est un signe de la maturité sexuelle et sous le contrôle des androgènes.

Les effets des PFC sur le développement fœtal semblent donc peu prononcés. À de fortes doses, quelques effets ont été décrits sur l'âge de la puberté mais de manière très indirecte et de manière parfois contradictoire chez le rat et la souris.

Effets sur la stéroïdogenèse mâle

Durant les dernières années, plusieurs travaux ont montré que les PFC tels que le PFOA ou l'acide perfluorododecanoïque (PFDoA) pourraient altérer la

synthèse d'androgènes chez les animaux. Biegel et coll. (1995) ont traité des cellules de Leydig isolées de rat adulte avec de l'ammonium perfluorooctanoate. À la dose de 250 µM, ce sel de PFOA inhibe la synthèse de testostérone induite par l'hCG dans des cultures de cellules de Leydig et ce en quelques heures (3 h). Ce composé semble donc agir directement sur les cellules de Leydig *in vitro*. À plus long terme (48 h), les auteurs rapportent également une augmentation de la synthèse d'œstradiol. Plus récemment, Zhao et coll. (2010a) ont étudié les effets du PFOA sur l'activité de deux enzymes déshydrogénases de la voie de biosynthèse de la testostérone, la 3bHSD et la 17bHSD. L'activité de ces enzymes a été analysée à partir de la fraction microsomiale de testicules de rat et dans des cellules de Leydig purifiées à partir de rats adultes (Sprague-Dawley). Le PFOA inhibe l'activité de la 3bHSD et la 17bHSD dans ces deux systèmes. Les IC50 calculées se situent entre 18 et 195 µM. Les auteurs ont également dosé la sécrétion de testostérone à partir de cellules de Leydig de rat en culture et décrivent une inhibition, presque complète, de la sécrétion de testostérone en conditions basale ou stimulée par la LH avec des doses de 10 et 100 µM de PFOA. Notons ici que ces doses excèdent largement les taux plasmatiques mesurés chez l'être humain (10 µM=4,1 mg/l).

Shi et coll. (2007) ont gavé par voie orale des rats adultes pendant deux semaines avec 1, 5 ou 10 mg/kg/j d'acide perfluorododecanoïque (PFDoA) et analysé les effets de ce traitement sur le testicule. Les auteurs rapportent une diminution de la production de testostérone aux doses de 5 et 10 mg. Dans ces travaux, l'expression des ARNm codant pour les enzymes de biosynthèse de la testostérone (STAR, P450scc, 3bHSD, 17bHSD et CYP17a) mesurée par PCR quantitative est également fortement réduite. L'expression du récepteur à la LH ou celle de l'aromatase n'est pas modifiée et les taux sériques de LH ou d'œstrogène sont peu affectés. Une augmentation de l'apoptose dans les différents types cellulaires est rapportée mais uniquement sur des critères morphologiques.

Les mêmes auteurs (Shi et coll., 2009) ont évalué les effets d'une exposition chronique de 110 jours à des doses plus faibles 0,2 ou 0,5 mg/kg/j de PFDoA sur la production de testostérone chez le rat (tableau 52.I). Ces traitements diminuent également la synthèse de testostérone. Cet effet s'accompagne d'une diminution des taux de STAR et de P450scc mais pas de l'ARNm de la 3βHSD. Enfin, la même équipe (Shi et coll., 2010) rapporte une baisse des taux sériques de progestérone dans les mêmes conditions, traitement chronique de 110 jours aux doses de 0,2 ou 0,5 mg/kg et une absence d'effet de la dose de 0,02 mg/kg/j sur ce paramètre. Par analyse en spectrométrie de masse, les auteurs ont identifié 40 protéines dont l'expression est modifiée dans les testicules des rats traités de manière chronique au PFDoA. Ces protéines sont essentiellement impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale et le stress oxydatif.

En résumé, il semble donc prouvé que les composés perfluorés peuvent inhiber la production d'androgènes testiculaires ; les mécanismes proposés, une inhibition directe de l'activité des enzymes de biosynthèse des stéroïdes et/ou une

diminution de la production de ces enzymes, sont cohérents mais nécessitent encore une démonstration au niveau moléculaire. Compte tenu du rôle important des androgènes pour la spermatogenèse, une association avec le nombre ou la qualité des spermatozoïdes est à rechercher mais il n'a pas été rapporté d'effet néfaste des PFC sur la production de sperme des rongeurs (York et coll., 2010). Ceci peut être dû notamment à la structure chimique des PFC utilisés. Le PFOA ne semble efficace qu'à de très fortes doses alors que le PFDoA semble avoir un effet similaire mais à des doses plus faibles. Les effets du PFDoA sur la fertilité n'ont pas été étudiés en détail.

Tableau 52.I : Paramètres phénotypiques affectés chez l'animal mâle

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Voies/Doses (mg/kg/j)	Références
Altérations des taux hormonaux	Rat Sprague-Dawley	PFDoA ; Gavage : 1-10	Shi et coll., 2007
Testostérone		PFDoA : Gavage : 0,2-0,5	Shi et coll., 2009
LH		Adulte	Shi et coll., 2010

Effets sur l'ovaire adulte et la stéroïdogenèse femelle

Butenhoff et coll. ont étudié les effets du PFOA (2004) et du PFHxS (2009) chez le rat femelle, études précédemment décrites. Jusqu'à des doses de 10 mg/kg/j, aucun effet n'a été observé par ces auteurs sur la fertilité des animaux. Les critères étudiés (durée du cycle, durée de la gestation, nombre de petits par portée, nombre de follicules primordiaux) apparaissent tous normaux. Notons cependant qu'aucun effet hépatique n'est observé chez les femelles, ceci probablement du fait d'une différence de taux sérique des PFC liée au sexe chez le rat. Ainsi, les taux sériques de PFHxS sont 6 à 8 fois plus faibles chez les femelles traitées par rapport aux mâles recevant les mêmes doses et les taux hépatiques 30 à 50 fois plus faibles. On peut donc questionner la validité du modèle rat femelle pour étudier les effets des PFC.

Austin et coll. (2003) ont administré par voie intrapéritonéale du PFOS (1 et 10 mg/kg/j) à des rates pendant deux semaines. Les auteurs rapportent alors une baisse de la régularité des cycles œstriens avec notamment la survenue de di-œstrus persistant.

Shi et coll. (2009) ont administré pendant 28 jours du PFDoA à des rates Sprague-Dawley. Des doses de 0,5, 1,5 ou 3 mg/kg/j ont été administrées par voie orale à partir de 24 jours postnatals. Dans ces conditions, les auteurs n'observent pas d'effets sur le nombre et la partition des follicules ovariens, pas de modification des cycles œstraux, pas de changement de la maturité sexuelle (âge au premier œstrus et ouverture vaginale) ni du poids de l'utérus. Cependant, une baisse du taux d'œstrogène circulant est observée à la dose de 3 mg/kg. Celui-ci s'accompagne d'une diminution de l'expression d'enzymes

de biosynthèse des stéroïdes (STAR et P450 scc). Cette diminution pourrait être la cause de la baisse du taux d'œstrogène circulant puisque les taux de LH et FSH ne sont pas affectés. L'expression des récepteurs à la LH (LHR) et aux œstrogènes (ERa et ERb) est également diminuée dans l'ovaire à cette dose. Enfin, l'expression de la 17bHSD ovarienne est augmentée à toutes les doses. Dans cette étude, les taux de PFDoA sériques n'ont pas été mesurés.

Lau et coll. (2006) ont montré que les souris CD1 ne présentaient pas de différence liée au sexe dans les taux sériques de PFOA mesurés après gavage. Les taux des souris mâles et femelles ayant reçu 20 mg/kg de PFOA sont voisins des taux retrouvés chez le rat mâle. De plus, chez les souris femelles, on retrouve une augmentation du poids du foie dès la dose de 1 mg/kg/j. De manière surprenante, chez la souris femelle, le PFOA semble augmenter la production de stéroïdes. Zhao et coll. (2010b) ont administré du PFOA sous la forme de sels d'ammonium à la dose de 5 mg/kg par voie orale à des souris C57Bl/6, 5 jours sur 7, pendant 4 semaines à partir de 21 jours postnatal (sevrage). Chez ces souris femelles, le PFOA augmente le taux de progestérone sérique sans affecter les taux d'œstradiol. Les auteurs démontrent également par Western blot une augmentation des enzymes 3bHSD et 17bHSD dans les ovaires des souris traitées, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la production de ce stéroïde.

En résumé, les PFC ne semblent pas modifier la fertilité femelle ou la morphologie ovarienne mais peuvent altérer la stéroïdogenèse ovarienne (tableau 52.II). Ces effets semblent variables en fonction de l'espèce (rat ou souris) ou de la nature chimique des PFC.

Tableau 52.II : Paramètres phénotypiques affectés dans les études chez les animaux femelles

Paramètres phénotypiques	Espèces/Lignée	Voie/Doses (mg/kg/j)/Périodes	Références
Modifications des paramètres morphologiques Poids utérus	Souris C57Bl/6 Souris Balb/c	PFOA ; Orale : 1 Postnatal (sevrage)	Zhao et coll., 2010b
Modification de la cyclicité	Rat	PFOS IP : 1 et 10 Adulte	Austin et coll., 2003
Développement glande mammaire	Souris C57Bl/6 Souris Balb/c Souris CD1	PFOA Orale : 5 Gestation /lactation	White et coll., 2007 White et coll., 2009 Zhao et coll., 2010b
Altérations des taux hormonaux Œstradiol, progestérone	Rates Sprague-Dawley Souris C57Bl/6	PFDoA ; Gavage : 3 ; Adultes PFOA ; Orale : 5 Postnatal (sevrage)	Shi et coll., 2009 Zhao et coll., 2010b

IP : voie intrapéritonéale

Effet sur la glande mammaire

Dans la même étude décrivant l'augmentation du taux de progestérone chez la souris femelle en réponse à l'administration de PFOA (Zhao et coll., 2010b), les auteurs ont étudié le développement de la glande mammaire et ont observé que le PFOA stimulait le développement de la glande mammaire. L'administration de PFOA augmente le nombre de bourgeons et de canaux terminaux. Des données similaires avaient déjà été rapportées par les travaux de Yang et coll. (2009) avec un protocole similaire. La nouveauté apportée par l'étude de Zhao et coll. (2010b) est la démonstration que cet effet du PFOA n'est pas retrouvé chez des souris ovariectomisées. Il semble donc que ce soit l'augmentation de la synthèse des stéroïdes ovariens qui soit responsable de la stimulation du développement de la glande mammaire. La sensibilité de la glande mammaire à un traitement par la progestérone ou/et l'œstradiol des souris traitées au PFOA est également augmentée. En effet, Zhao et coll. (2010b) ont démontré que celles-ci formaient plus de canaux terminaux en réponse à ces stéroïdes que les souris non traitées au PFOA. Les auteurs montrent que cette augmentation de sensibilité s'accompagne d'une augmentation de l'expression de ERα, un récepteur de l'œstradiol, et de l'amphiréguline, un gène induit par l'œstradiol dans la glande mammaire. Cette augmentation du développement de la glande mammaire, et notamment du nombre des bourgeons terminaux, en réponse au PFOA pourrait donc provenir en partie d'un effet indirect du PFOA via l'augmentation de la production de progestérone ovarienne. Un dernier point étudié par les auteurs est l'occurrence des effets observés du PFOA chez des souris mutantes pour PPARα, une cible connue du PFOA dans le foie et pour la tumorigenèse hépatique chez la souris. Les auteurs retrouvent les effets du PFOA sur la glande mammaire chez ces souris indiquant de ce fait que ces effets sont indépendants de PPARα. Ce point est important car il aborde un possible effet du métabolisme hépatique sur les taux des hormones stéroïdes. Ce métabolisme n'étant pas modifié chez les animaux PPARα mutants traités au PFOA, celui-ci n'est probablement pas impliqué directement dans les effets du PFOA sur la glande mammaire. Ce travail soulève deux questions. La première considérée par les auteurs est une éventuelle augmentation de la susceptibilité des glandes mammaires des animaux traités au PFOA à des agents carcinogènes, suggérant une implication favorable des PFOA dans la survenue des cancers du sein. En effet, les bourgeons terminaux sont la principale cible des agents carcinogènes dans la glande mammaire. La seconde question, non considérée, est l'impact des PFOA sur le développement des follicules et la production d'ovocytes par l'ovaire. Aucune étude n'a encore abordé ces deux questions chez la souris.

Le groupe de Zhao et coll. (2010b) a retrouvé les mêmes effets du PFOA chez des souris sauvages avec un protocole semblable de gavage pendant la période péripurbertaire. Une donnée intéressante apportée par les auteurs est que ceux-ci observent des effets opposés du PFOA (5 mg/kg/j) sur le nombre de bourgeons terminaux dans la glande mammaire dans deux lignées différentes

de souris. Dans la lignée C57Bl/6, Zhao et coll. retrouvent une stimulation de ce nombre alors qu'ils observent une diminution dans la lignée Balb/c. Des effets opposés sont décrits sur le poids de l'utérus dans ces deux lignées de souris en réponse au PFOA (1 mg/kg/j) : une augmentation dans le fond C57Bl/6 et une diminution dans le fond Balb/c. Les mécanismes en cause dans cette différence de sensibilité entre ces deux lignées de souris sont encore inconnus mais cela pose la question des effets du PFOA dans la population humaine, qui est certainement très diverse génétiquement. En effet, comment mettre en évidence une corrélation entre des taux de PFOA et une altération de la différenciation d'un tissu sur une population si sur certains individus les effets du PFOA sont stimulants et inhibiteurs chez d'autres. Il conviendrait donc d'identifier les déterminants génétiques ou métaboliques en cause avant de pouvoir réaliser d'éventuelles études épidémiologiques fiables.

Les effets d'un traitement au PFOA ont également été étudiés sur le développement de la glande mammaire pendant la gestation. White et coll. (2007) ont gavé des souris CD1 avec 5 mg/kg/j de PFOA pendant la gestation (jours 1 à 17) et étudié l'histologie de la glande mammaire pendant la période de lactation à 10 et 20 jours postnatals. Les auteurs décrivent un retard de différenciation de la glande mammaire lors de la lactation en réponse au PFOA. Celui-ci s'illustre par un défaut des alvéoles contenant du lait et une altération de l'expression des gènes codants pour les protéines du lait. L'involution de la glande mammaire correspondant au sevrage est également retardée. La même équipe (White et coll., 2007) démontre que le développement de la glande mammaire des souriceaux exposés *in utero* est également perturbé. La croissance et la ramification des structures épithéliales sont réduites. Les auteurs ont estimé les taux sériques de PFOA chez les mères allaitantes et les souriceaux et rapportent des taux entre 30 et 50 µg/ml aux jours 10 et 20. Enfin, dans une seconde publication (White et coll., 2009), les auteurs démontrent qu'une courte exposition au PFOA en fin de vie fœtale (jours 15 à 17) ou uniquement à travers la lactation pendant la vie postnatale produit des altérations durables du développement de la glande mammaire observables à 63 jours. À cet âge, les taux de PFOA sériques ont considérablement diminué (<0,4 µg/ml). Les auteurs décrivent une altération de l'arborisation épithéliale dans le coussin adipeux de la glande mammaire des animaux exposés en période postnatale à 18 mois d'âge. Ces observations sont remarquables, car en dépit de la forte persistance du PFOA dans l'organisme, ces travaux suggèrent que l'altération de la glande mammaire induite par une brève exposition au PFOA au cours du développement puisse persister à très long terme. Dans cette étude très détaillée, les auteurs rapportent que le transfert de PFOA par la lactation, étudié par des expériences d'adoption à la naissance, est efficace, et que des taux circulants de l'ordre de 2 µg/ml sont suffisants pour inhiber le développement et la différenciation de la glande mammaire.

En résumé, plusieurs travaux démontrent des effets du PFOA sur le développement ou la différenciation de la glande mammaire chez la souris. Des différences liées aux lignées de souris sont rapportées. Les effets chez la femelle adulte pourraient être dépendants d'une action primaire sur la production de stéroïdes ovariens. Cependant, un tel mécanisme ne peut expliquer les effets dépendant d'un traitement *in utero* et observés avant la puberté.

En conclusion, la structure chimique des PFC semble être une variable importante dans la prise en compte des effets de ces substances. Un autre paramètre majeur est l'espèce (rat) ou la lignée de souris utilisée. Les effets potentiels des PFC sur la stéroïdogenèse mâle et femelle n'apparaissent pas modifier la fertilité des animaux à des doses compatibles avec celles pouvant être observées chez l'être humain. Plus préoccupante, la modification de la sensibilité aux hormones stéroïdes décrite chez la femelle pourrait altérer le développement de la glande mammaire.

Bibliographie

AUSTIN ME, KASTURI BS, BARBER M, KANNAN K, MOHANKUMAR PS, MOHANKUMAR SM. Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ Health Perspect* 2003, **111** : 1485-1489

BIEGEL LB, LIU RC, HURTT ME, COOK JC. Effects of ammonium perfluorooctanoate on Leydig cell function : in vitro, in vivo, and ex vivo studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, **134** : 18-25

BUTENHOFF JL, KENNEDY GL JR., FRAME SR, O'CONNOR JC, YORK RG. The reproductive toxicology of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in the rat. *Toxicology* 2004, **196** : 95-116

BUTENHOFF JL, CHANG SC, EHRESMAN DJ, YORK RG. Evaluation of potential reproductive and developmental toxicity of potassium perfluorohexanesulfonate in Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 331-341

CHANG SC, EHRESMAN DJ, BJORK JA, WALLACE KB, PARKER GA, et coll. Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctanesulfonate (K+PFOS) in rats : toxicokinetics, thyroid hormone status, and related gene expression. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 387-399

LAU C, THIBODEAUX JR, HANSON RG, NAROTSKY MG, ROGERS JM, et coll. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol Sci* 2006, **90** : 510-518

SHI Z, ZHANG H, LIU Y, XU M, DAI J. Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicol Sci* 2007, **98** : 206-215

SHI Z, ZHANG H, DING L, FENG Y, XU M, DAI J. The effect of perfluorododecanonic acid on endocrine status, sex hormones and expression of steroidogenic genes in pubertal female rats. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 352-359

SHI Z, ZHANG H, DING L, FENG Y, WANG J, DAI J. Proteomic analysis for testis of rats chronically exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicol Lett* 2010, **192** : 179-188

WHITE SS, CALAFAT AM, KUKLENYIK Z, VILLANUEVA L, ZEHR RD, et coll. Gestational PFOA exposure of mice is associated with altered mammary gland development in dams and female offspring. *Toxicol Sci* 2007, **96** : 133-144

WHITE SS, KATO K, JIA LT, BASDEN BJ, CALAFAT AM, et coll. Effects of perfluorooctanoic acid on mouse mammary gland development and differentiation resulting from cross-foster and restricted gestational exposures. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 289-298

WOLF CJ, FENTON SE, SCHMID JE, CALAFAT AM, KUKLENYIK Z, et coll. Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures. *Toxicol Sci* 2007, **95** : 462-473

YANG C, TAN YS, HARKEMA JR, HASLAM SZ. Differential effects of peripubertal exposure to perfluorooctanoic acid on mammary gland development in C57Bl/6 and Balb/c mouse strains. *Reprod Toxicol* 2009, **27** : 299-306

YORK RG, KENNEDY GL JR, OLSEN GW, BUTENHOFF JL. Male reproductive system parameters in a two-generation reproduction study of ammonium perfluorooctanoate in rats and human relevance. *Toxicology* 2010, **271** : 64-72

ZHAO B, CHU Y, HARDY DO, LI XK, GE RS. Inhibition of 3beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat Leydig cells by perfluorooctane acid. *J Ster Biochem Mol Biol* 2010a, **118** : 13-17

ZHAO Y, TAN YS, HASLAM SZ, YANG C. Perfluorooctanoic acid effects on steroid hormone and growth factor levels mediate stimulation of peripubertal mammary gland development in C57Bl/6 mice. *Toxicol Sci* 2010b, **115** : 214-224

53
Études chez les poissons

De très nombreuses études ont été consacrées à la détection des PFC dans l'environnement. Une revue générale récente est disponible (Suja et coll., 2009). Il est intéressant d'avoir une idée globale de la quantité de PFC présents dans l'environnement aquatique de façon à relier les effets observés sur les organismes modèles aux quantités détectées. Il faut cependant noter que les organismes où l'on détecte les PFC sont souvent bien différents de ceux dans lesquels on étudie leurs effets. Cette différence dans l'échantillonnage taxonomique sera certainement à prendre en compte. Les PFC sont présents dans les eaux de surface européennes à des concentrations de 1,371 à 32 ng/l (Loos et coll., 2009) et dans les océans à des concentrations de 8,6 à 73 pg/l (PFOS) et 52 à 439 pg/l (PFOA) (Yamashita et coll., 2008) ; on s'attend donc à une contamination des organismes aquatiques. Dans l'étude de Fernandez-Sanjuan et coll. (2010), des niveaux de 0,23 à 144 ng/g de poids humide (gww) de PFOS et des niveaux de 0,14 à 4,3 ng/gww de PFOA ont été détectés dans différentes espèces de poissons téléostéens, de crustacés et de larves d'insectes. Aucun des mollusques bivalves étudiés n'a montré de contamination, ce qui est étonnant au regard du comportement filtreur de ces animaux.

D'autres études confirment ces données. Ainsi, chez l'esturgeon (*Acipenser sinensis*) d'élevage, des PFC ont été détectés à des niveaux de 35,1 ng/gww (Peng et coll., 2010). Une accumulation a été notée dans le foie, ce qui est intéressant au regard du mode d'action présumé de ces molécules, via PPARα. Ces composés sont présents chez des espèces de consommation courante comme le thon qui pourtant vit en mer loin des zones polluées, ce qui en fait un excellent indicateur de la pollution par ces molécules. Ainsi, Hart et coll. (2008) ont détecté de façon quasi systématique le PFOS et l'acide perfluoroundécanoique (PFUnDA) dans le foie du thon skipjack (*Katsuwonus pelamis*) à des niveaux allant jusqu'à 58,9 ng/gww (PFOS) et 31,6 g/gww (PFUnDA). Dans cette étude, le PFOA est beaucoup plus rarement trouvé alors que dans d'autres études portant sur les organismes marins il est détecté à de plus grandes quantités que le PFOS (Kannan et coll., 2002). Chez des poissons de pêche sportive (*Micropterus dolomieu*) de l'État de New York, des niveaux de 315 ng/gww de PFOS ont été relevés (Sinclair et coll., 2006). Des niveaux encore plus élevés ont été observés dans trois espèces de poissons téléostéens (poisson rouge, *Carassius auratus* ; carpe commune, *Cyprinus carpio* ; anguille, *Anguilla anguilla*) dans des rivières de Belgique (Hoff et coll.,

2005). Ainsi, dans le foie, le PFOS est présent de 250 à 9 031 ng/gww, c'est-à-dire aux plus hauts niveaux détectés à ce jour.

Données de toxicité

Des approches de toxicité classiques ont été menées dans différentes espèces. Ainsi chez le medaka, Ji et coll. (2008) ont montré que le PFOS était environ 10 fois plus toxique que le PFOA et ont mis en évidence un effet de ces molécules sur la génération F1 non exposée, de parents F0 exposés. À des concentrations de 2 mg/l, le PFOS induit des malformations d'embryons de zebrafish (courbure de l'épine dorsale, vessie natatoire non gonflée, battements cardiaques diminués, faibles mouvements) avec une dose létale LC50 de 2,2 mg/l (Shi et coll., 2008 ; Huang et coll., 2010). Des signes de mort cellulaire ont été détectés à divers endroits dans l'embryon. Ces effets ont été reliés à des inductions et répressions de divers gènes importants au cours du développement et ont été étudiés sous l'angle d'une perturbation de la signalisation thyroïdienne.

Études chez les mâles

Chez le medaka, l'effet de deux fluorotélomères (6 :2 FTOH et 8 :2 FTOH) et du NFDH sur la production de vitellogénine par les mâles a été étudié (Ishibashi et coll., 2008). Cet effet est observé à des doses de 1 µg/M et a été relié à une action de ces molécules via ERa. Les effets de PFOS et PFOA n'ont pas été reportés dans cette étude. Cependant, dans un modèle d'hépatocytes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en culture, une induction de la vitellogénine par PFOS et PFOA, mais aussi par 6 :2FTOH a bien été observée à des doses de 10 à 30 µM (Liu et coll., 2007b). Ces effets sont bloqués par le tamoxifène, ce qui suggère qu'ils sont médiés par les récepteurs des œstrogènes. D'autres fluorotélomères (4 :2 FTOH et 8 :2 FTOH) sont inactifs dans ce test. Le 6 :2FTOH est capable d'activer la production de la vitellogénine et l'expression de ERa chez des zebrafish mâles traités à des doses de 0,3 à 3 mg/l. Une modification concomitante des hormones stéroïdiennes (augmentation de testostérone) et de l'expression de leurs enzymes de synthèse (CYP17 augmentée, CYP19 diminuée) a été observée (Liu et coll., 2009a). Des effets très similaires ont été décrits chez d'autres espèces comme le vairon (Ankley et coll., 2005). Chez un modèle de poisson ovovivipare, *Xiphophorus helleri*, une induction de la vitellogénine à 2,5 mg/l de PFOS a été observée après des traitements de 3 à 4 semaines, mais cette induction a été précédée par une baisse de la vitellogénine pendant les deux premières semaines de traitement (Han et Fang, 2010). Cet effet sur la vitellogénine est notée également chez la carpe après traitement au PFOA (500 µg/l) mais pas au PFOS (Kim et coll.,

2010). Chez un autre cypriniforme, le vairon rare (*Gobiocypris rarus*), une augmentation de la vitellogénine et de l'expression de ERb a été rapportée après traitement au PFOA (3-10 mg/l) de mâles adultes (Wei et coll., 2007). C'est la seule espèce pour laquelle des signes d'ovotestis ont également été observés, ce qui suggère clairement une activité œstrogénique.

Études chez les femelles

Une étude sur les effets chroniques de PFOS (10 à 250 µg/l) a montré une diminution de la croissance de la gonade chez la femelle et une altération du développement des embryons pondus par ces femelles traitées (Du et coll., 2009). Un effet de 6 :2 FTOH sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, avec une diminution du rapport T/E2, a été observé chez des femelles de zebrafish traitées à des doses de 0,3 à 3 mg/l (Liu et coll., 2009a). Des femelles de porte-épée (*Xiphophorus helleri*) traitées au PFOS à 2,5 mg/l montrent une augmentation de l'index gonadosomatique et une létalité augmentée de leur descendance (Han et Fang, 2010). Il a été montré chez le vairon (*Pimephales promelas*), que PFOS produit des altérations histologiques des ovaires chez les femelles traitées (Ankley et coll., 2005).

Effets métaboliques dans le foie

In vivo et *in vitro* les PFC, et notamment PFOS et PFOA, ont des effets métaboliques sur le foie. Dans plusieurs espèces (la truite *Oncorhynchus mykiss*, le vairon *Pimephales promelas* ou des espèces plus rarement testées comme *Catostomus commersoni*, *Notropis hudsonius* ou *Semotilus atromaculatus*), un effet inducteur de l'activité de l'acyl-CoA oxydase a été montré, les effets sur la vitellogénine étant moins largement observés (Oakes et coll., 2005). Ces effets hépatiques ont été retrouvés dans des espèces de consommation courante comme la plie (*Pleuronectes platessa*) ou le tacaud (*Trisopterus luscus*) où le PFOS induit une nécrose cellulaire associée à une augmentation de deux aminotransférases (Hoff et coll., 2003a). Cet effet de PFOS a été reproduit chez la carpe après des traitements à 864 ng/g (Hoff et coll., 2003b). Cependant, cette étude ne montre pas d'effet sur la prolifération des peroxysomes. Ceci a été confirmé chez la truite où le PFOA induit pourtant une carcinogenèse hépatique à 50 mg/kg/j (Tilton et coll., 2008). Le lien entre la prolifération des peroxysomes et l'activation de PPARa n'est pas encore très clair chez les poissons téléostéens. Une étude récente sur le medaka a montré que le PFOA induisait une augmentation de l'activité de l'acyl-CoA oxydase peroxysomale et de la catalase ainsi qu'une augmentation de l'expression de PPARα (Yang, 2010). Des effets sur l'expression des cytokines inflammatoires (IL6, IL1β, TNFα) ont également été observés.

Au niveau cellulaire, les effets de PFOS et PFOA ont été étudiés sur un modèle d'hépatocytes primaire de tilapia (Liu et coll., 2007a et 2007b). Ces études ont montré que ces composés entraînent un stress oxydatif et de l'apoptose, avec une implication des caspases, à des concentrations de 5 à 30 mg/l ; aucun effet n'étant observé à 1 mg/l (Liu et coll., 2007a). Une induction de vitellogénine a également été notée (Liu et coll., 2007b). Une étude similaire, menée sur des hépatocytes isolés de saumon (*Salmo salar*), a mis en évidence une induction par des concentrations de PFOS de 6 à 25 mg/l de gènes impliqués dans le stress cellulaire (HSP70, glutathion peroxydase) mais aussi dans le métabolisme des xénobiotiques (CYP1A, CYP3A, glutathion-S-transferase et UDP-glucuronosoyl-transférase). Une induction des PPAR (α, β et γ) et de l'acylCoA oxydase a également été mise en évidence (Vatland et coll., 2008). Une forte induction hépatique de PPAR γ mais non α a été observée après traitement de *Gobiocypris rarus* par des doses de PFOA de 3 mg/l, une diminution aux plus fortes doses (30 mg/l) étant rapportée (Liu et coll., 2009b). Toujours chez *Gobiocypris*, une régulation de l'expression des apolipoprotéines (diminution de ApoA1, ApoA-IV, ApoCII, ApoM et ApoC1 ; augmentation de ApoE) a été observée à des doses de PFOA de 10 mg/l. Contrairement à l'étude précédente, on note une augmentation de l'expression de PPARα chez ces poissons à 10 mg/l et comme dans l'étude précédente une augmentation forte de PPARγ : PPARγ semble donc être une cible plus importante de PFOA dans le foie que PPARα chez cette espèce (Fang et coll., 2010). Des effets très similaires ont été décrits après des traitements de mulets (*Chelon labrosus*) juvéniles par du PFOS à 0,46 ppm (Bilbao et coll., 2010). Un lien avec le stress cellulaire et notamment la production de radicaux libres (ROS) a également été mis en évidence chez l'embryon entier de zebrafish après traitement au PFOS à des doses de 100 à 200 µg/l (Shi et Zhou, 2010). Parallèlement, une étude de toxicité chronique de PFOS (10 à 250 µg/l) de la même équipe a montré toute une gamme d'effets histologiques, notamment l'accumulation de gouttelettes lipidiques pouvant être reliés à une hépatotoxicité (Du et coll., 2009). Une augmentation du rapport hépatosomatique et des anomalies histologiques ont été également observées après un traitement par PFOS (2,5 mg/l) d'un poisson ovovivipare *Xiphophorus helleri* (Han et Fang, 2010).

Approche génomique chez les poissons téléostéens

Différentes études de génomique décrivant les effets des PFC (PFOA et PFOS) ont été publiées, que ce soit au niveau ARN (*microarrays*) ou protéines (protéomique). Ces études ont été menées sur la truite arc-en-ciel, sur le zebrafish, sur la carpe et sur le vairon rare, *Gobiocypriis rarus*, seule espèce pour laquelle à la fois des données de protéomique et de *microarrays* sont disponibles.

Chez la truite, les effets transcriptionnels de PFOA ont été étudiés après un traitement à 50 mg/kg/j qui induit une carcinogenèse hépatique (Tilton et coll., 2008). Cette formation de tumeurs est indépendante de la prolifération des peroxysomes car aucune activité liée à la β-oxydation peroxysomale ou à la catalase n'a été observée dans la signature transcriptionnelle induite par PFOA. À l'opposé, le traitement par le PFOA, comme un traitement au DHEA réalisé en parallèle induit une signature très comparable à celle obtenue par E2, ce qui suggère que c'est cette voie de signalisation qui est induite. Dans cette même étude, les gènes induits par le clofibrate, un agoniste de PPARα chez les mammifères, sont fortement différents de ceux régulés par le PFOA. Outre les vitellogénines, de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, le transport des protéines, l'immunité et le métabolisme sont régulés par le PFOA et par E2. Une étude assez similaire menée après exposition au PFOS (0,1, 0,5, 1 mg/l) chez la carpe a montré dans le foie la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la reproduction et la réponse au stress. Cependant, aucune comparaison avec les effets d'autres molécules (par ex. les œstrogènes) n'a été entreprise dans cette étude.

Chez le zebrafish, une étude de protéomique a suivi les effets induits par le PFOS à 0,5 mg/l sur des embryons après 192 heures de traitement après fécondation (Shi et coll., 2009). Les résultats révèlent que 69 protéines sont différenciellement exprimées par rapport aux témoins et 18 protéines ont pu être identifiées. Ces protéines sont impliquées dans le métabolisme énergétique, la détoxification, le transport des lipides et le métabolisme des stéroïdes. Aucune comparaison avec les effets des œstrogènes ou d'agonistes des PPAR n'a été réalisée.

Chez *Gobiocypris rarus*, trois études génomiques ont été réalisées (Wei et coll., 2008a, 2008b, 2009) et toutes étudient les effets de PFOA au niveau hépatique. Après un traitement à 10 mg/l pendant 28 jours, la première étude (Wei et coll., 2008a) différencie les signatures transcriptomiques observées dans les deux sexes : respectivement 124 et 171 gènes sont modulés par le PFOA chez les mâles et les femelles et seuls 43 gènes sont en commun. Ceci suggère qu'il faudrait systématiquement distinguer les effets des PFC selon le sexe. Comme dans les études précédentes, des classes de gènes très diverses, impliquées dans le métabolisme et le transport des lipides, l'action des hormones, la réponse immune et la fonction des mitochondries sont modulées par le PFOA. Des gènes de la biosynthèse des acides gras sont inhibés alors que ceux impliqués dans le trafic intracellulaire du cholestérol voient leur expression augmentée. Les gènes impliqués dans la β-oxydation des acides gras ne sont altérés que chez les femelles. Parallèlement, on observe une inhibition de gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (déiodases de type II) et une induction de gènes de réponse aux œstrogènes (vitellogénine 3). Ces données montrent bien que le PFOA altère les équilibres hormonaux à de nombreux niveaux. L'étude de protéomique réalisée par les mêmes auteurs confirme largement les conclusions de ces travaux de

transcriptomique (Wei et coll., 2008b). Une étude de transcriptomique sur des hépatocytes en culture a comparé les effets de différents PFC parmi lesquels le PFOS, le PFOA et le 8 :2 TFOH, les effets de différents mélanges de composés ont également été étudiés (Wei et coll., 2009). De façon intéressante, ces composés régulent une série de gènes identiques (11 augmentés, 7 inhibés) bien que le 8 :2 FTOH produise une signature assez différente de celle des autres PFC. Parmi ces gènes systématiquement retrouvés, on note CYP3A, la *thioredoxine interacting protein*, et la L-FABP. Comme précédemment, des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des acides gras, le métabolisme des xénobiotiques, la réponse immunitaire et le stress oxydatif voient leur expression modifiée. Dans les mélanges, on observe souvent des gènes qui ne sont régulés par aucun des PFC utilisés seuls, ce qui suggère que plusieurs molécules ensemble ont des actions spécifiques.

En conclusion, de nombreuses études confirment que les PFC (PFOS, PFOA) sont détectés dans les eaux de surface européennes et dans les océans, ce qui sous-tend une contamination des organismes aquatiques. Chez les poissons mâles, les PFC induisent la production de vitellogénine, effet médié par les récepteurs des œstrogènes. Des altérations histologiques des ovaires ont été observées chez les femelles exposées.

Différentes études de génomique décrivant les effets des PFC (PFOA et PFOS) ont été publiées. Des signatures transcriptomiques différentes sont observées pour les deux sexes. Les gènes modulés par le PFOA sont de classes très diverses (métabolisme et transport des lipides, action des hormones, réponse immune et fonction des mitochondries). L'effet des mélanges sur les gènes est souvent différent de celui obtenu avec chacun des composants isolés.

Bibliographie

ANKLEY GT, KUEHL DW, KAHL MD, JENSEN KM, LINNUM A, et coll. Reproductive and developmental toxicity and bioconcentration of perfluorooctanesulfonate in a partial life-cycle test with the fathead minnow (Pimephales promelas). *Environ Toxicol Chem* 2005, **24** : 2316-2324

BILBAO E, RAINGEARD D, DE CERIO OD, ORTIZ-ZARRAGOITIA M, RUIZ P, et coll. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet Chelon labrosus. *Aquat Toxicol* 2010, **98** : 282-296

DU Y, SHI X, LIU C, YU K, ZHOU B. Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: a partial life-cycle test. *Chemosphere* 2009, **74** : 723-729

FANG X, WEI Y, LIU Y, WANG J, DAI J. The identification of apolipoprotein genes in rare minnow (Gobiocypris rarus) and their expression following perfluorooctanoic acid exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010, **151** : 152-159

FERNÁNDEZ-SANJUAN M, MEYER J, DAMÁSIO J, FARIA M, BARATA C, LACORTE S. Screening of perfluorinated chemicals (PFC) in various aquatic organisms. *Anal Bioanal Chem* 2010, **398** : 1447-1456

HAN J, FANG Z. Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in ovoviparous swordtail fish (Xiphophorus helleri) exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquat Toxicol* 2010, **99** : 281-290

HART K, KANNAN K, TAO L, TAKAHASHI S, TANABE S. Skipjack tuna as a bioindicator of contamination by perfluorinated compounds in the oceans. *Science of the Total Environment* 2008, **403** : 215-221

HOFF PT, VAN DE VIJVER K, VAN DONGEN W, ESMANS EL, BLUST R, DE COEN WM. Perfluorooctane sulfonic acid in bib (Trisopterus luscus) and plaice (Pleuronectes platessa) from the Western Scheldt and the Belgian North Sea: distribution and biochemical effects. *Environ Toxicol Chem* 2003a, **22** : 608-614

HOFF PT, VAN DONGEN W, ESMANS EL, BLUST R, DE COEN WM. Evaluation of the toxicological effects of perfluorooctane sulfonic acid in the common carp (Cyprinus carpio). *Aquat Toxicol* 2003b, **62** : 349-359

HOFF PT, VAN CAMPENHOUT K, VAN DE VIJVER K, COVACI A, BERVOETS L, et coll. Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium) : relationships with biochemical and organismal effects. *Environ Pollut* 2005, **137** : 324-333

HUANG H, HUANG C, WANG L, YE X, BAI C, et coll. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonicacid (PFOS). *Aquat Toxicol* 2010, **98** : 139-147

ISHIBASHI H, YAMAUCHI R, MATSUOKA M, KIM JW, HIRANO M, et coll. Fluorotelomer alcohols induce hepatic vitellogenin through activation of the estrogen receptor in male medaka (Oryzias latipes). *Chemosphere* 2008, **71** : 1853-1859

JI K, KIM Y, OH S, AHN B, JO H, CHOI K. Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid on freshwater macroinvertebrates (Daphnia magna and Moina macrocopa) and fish (Oryzias latipes). *Environ Toxicol Chem* 2008, **27** : 2159-2168

KANNAN K, CORSOLINI S, FALANDYSZ J, OEHME G, FOCARDI S, GIESY JP. Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environmental Science and Technology* 2002, **36** : 3210-3216

KIM WK, LEE SK, JUNG J. Integrated assessment of biomarker responses in common carp (Cyprinus carpio) exposed to perfluorinated organic compounds. *J Hazard Mater* 2010, **180** : 395-400

LIU C, YU K, SHI X, WANG J, LAM PK, WU RS, ZHOU B. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (Oreochromis niloticus). *Aquat Toxicol* 2007a, **82** : 135-143

LIU C, DU Y, ZHOU B. Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes. *Aquat Toxicol* 2007b, **85** : 267-277

LIU Y, WANG J, WEI Y, ZHANG H, LIU Y, DAI J. Molecular characterization of cytochrome P450 1A and 3A and the effects of perfluorooctanoic acid on their mRNA levels in rare minnow (Gobiocypris rarus) gills. *Aquat Toxicol* 2008, **88** : 183-190

LIU C, YU L, DENG J, LAM PK, WU RS, ZHOU B. Waterborne exposure to fluorotelomer alcohol 6:2 FTOH alters plasma sex hormone and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis of zebrafish. *Aquat Toxicol* 2009a, **93** : 131-137

LIU Y, WANG J, LIU Y, ZHANG H, XU M, DAI J. Expression of a novel cytochrome P450 4T gene in rare minnow (Gobiocypris rarus) following perfluorooctanoic acid exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009b, **150** : 57-64

LOOS R, GAWLIK BM, LOCORO G, RIMAVICIUTE E, CONTINI S, BIDOGLIO G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Pollut* 2009, **157** : 561-568

OAKES KD, SIBLEY PK, MARTIN JW, MACLEAN DD, SOLOMON KR, et coll. Short-term exposures of fish to perfluorooctane sulfonate: acute effects on fatty acyl-coa oxidase activity, oxidative stress, and circulating sex steroids. *Environ Toxicol Chem* 2005, **24** : 1172-1181

PENG H, WEI Q, WAN Y, GIESY JP, LI L, HU J. Tissue distribution and maternal transfer of poly- and perfluorinated compounds in Chinese sturgeon (Acipenser sinensis): implications for reproductive risk. *Environ Sci Technol* 2010, **44** : 1868-1874

SHI X, ZHOU B. The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos. *Toxicol Sci* 2010, **115** : 391-400

SHI X, DU Y, LAM PKS, WU RSS, ZHOU B. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Tox Applied Pharmacol* 2008, **230** : 23-32

SHI X, YEUNG LW, LAM PK, WU RS, ZHOU B. Protein profiles in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 2009, **110** : 334-340

SINCLAIR E, MAYACK DT, ROBLEE K, YAMASHITA N, KANNAN K. Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State. *Arch Environ Contam Toxicol* 2006, **50** : 398-410.

SUJA F, PRAMANIK BK, ZAIN SM. Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFC) in the water environment: a review paper. *Water Sci Technol* 2009, **60** : 1533-1544

TILTON SC, ORNER GA, BENNINGHOFF AD, CARPENTER HM, HENDRICKS JD, et coll. Genomic profiling reveals an alternate mechanism for hepatic tumor promotion by perfluorooctanoic acid in rainbow trout. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1047-1055

VATLAND KRØVEL A, SØFTELAND L, TORSTENSEN B, OLSVIK PA. Transcriptional effects of PFOS in isolated hepatocytes from Atlantic salmon Salmo salar L. *Comp Biochem Physiol C* 2008, **148** : 14-22

WEI Y, DAI J, LIU M, WANG J, XU M, et coll. Estrogen-like properties of perfluorooctanoic acid as revealed by expressing hepatic estrogen-responsive genes in rare minnows (Gobiocypris rarus). *Environ Toxicol Chem* 2007, **26** : 2440-2447

WEI Y, LIU Y, WANG J, TAO Y, DAI J. Toxicogenomic analysis of the hepatic effects of perfluorooctanoic acid on rare minnows (Gobiocypris rarus). *Toxicol Appl Pharmacol* 2008a, **226** : 285-297

WEI Y, CHAN LL, WANG D, ZHANG H, WANG J, DAI J. Proteomic analysis of hepatic protein profiles in rare minnow (Gobiocypris rarus) exposed to perfluorooctanoic acid. *J Proteome Res* 2008b, **7** : 1729-1739

WEI Y, SHI X, ZHANG H, WANG J, ZHOU B, DAI J. Combined effects of polyfluorinated and perfluorinated compounds on primary cultured hepatocytes from rare minnow (Gobiocypris rarus) using toxicogenomic analysis. *Aquat Toxicol* 2009, **95** : 27-36

YAMASHITA N, KANNAN K, TANIYASU S, PETRICK G, WEI S, et coll. Perfluorinated acids as novel chemical tracers of global circulation of ocean waters. *Chemosphere* 2008, **70** : 1247-1255

YANG JH. Perfluorooctanoic acid induces peroxisomal fatty acid oxidation and cytokine expression in the liver of male Japanese medaka (Oryzias latipes). *Chemosphere* 2010, **81** : 548-552

54
Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des PFC ne sont pas clairement identifiés. Plusieurs études ont analysé les récepteurs nucléaires impliqués chez les mammifères et les poissons.

Récepteurs nucléaires

Vanden Heuvel et coll. (2006) ont utilisé un système chimérique de récepteur nucléaire possédant un site de liaison au ligand et un site de liaison à l'ADN « Gal4 » pour étudier l'activation, chez l'homme, la souris et le rat, de différents récepteurs nucléaires humains (récepteurs PPARα, PPARβ et PPARγ, LXRα, LXRβ et RXRα) par le PFOS et le PFOA. Leurs résultats ont montré que le récepteur PPARα est la cible principale de ces deux PFC, bien que le récepteur PPARγ soit également activé dans une plus faible mesure. Ces travaux ont été confirmés par d'autres équipes (Shipley et coll., 2004 ; Takacs et Abbott, 2007 ; Rosen et coll., 2008 ; Wolf et coll., 2008 ; Bjork et Wallace, 2009 ; Foreman et coll., 2009).

Cependant, des expériences réalisées sur des souris déficientes en PPARα indiquent qu'une partie des gènes (5-10 %) dont l'expression est modulée par les PFC serait sous le contrôle du récepteur nucléaire CAR (*Constitutive activated receptor*) (Cheng et Klaassen, 2008 ; Rosen et coll., 2008). Il est à noter qu'une étude récente a montré un effet de PFOA sur l'ovaire et sur la glande mammaire chez des souris mutantes pour PPARα, effet qui serait également indépendant de PPARα (Zhao et coll., 2010).

Mécanismes d'action chez les poissons

Chez les poissons, trois voies de signalisation dépendant de la famille des récepteurs nucléaires ont été associées aux effets de PFC : la voie des œstrogènes, les PPAR et la voie de réponse aux hormones thyroïdiennes. Il est difficile pour l'instant de déterminer si ces trois voies sont altérées par les mêmes molécules, si elles le sont ensemble et quelles sont les cibles directes des PFC.

En ce qui concerne la voie de réponse des œstrogènes, Ishibashi et coll. (2008) ont observé que deux fluorotélomères (6 :2 FTOH et 8 :2 FTOH) et

du NFDH sont capables d'activer transcriptionnellement le ERα mais pas le ERβ de medaka. D'autres PFC comme le PFOS et le PFOA ne montrent pas ces effets. De façon cohérente, 6 :2 FTOH, 8 :2 FTOH et NFDH induisent l'expression de la vitellogénine et de ERα chez les mâles, les effets de PFOS et PFOA dans ce test n'ayant malheureusement pas été étudiés chez la même espèce. Cependant chez le tilapia, une induction de la vitellogénine par le PFOS et le PFOA a bien été démontrée et cet effet est ER dépendant car il est bloqué par une co-exposition au tamoxifène (Liu et coll., 2007). Ces données suggèrent que tous les PFC n'ont sans doute pas le même mécanisme d'action : certains agiraient via ERα (FTOH) et d'autres via PPARα. En lien avec une perturbation de la signalisation œstrogénique, une diminution de l'expression de l'aromatase (CYP19a et CYP19b) a été observée sur des embryons de zebrafish traités à des doses de 0,1 à 5 mg/l de PFOS (Shi et coll., 2008). Des traitements de zebrafish adultes à des doses de 0,3 à 30 mg/l de 6 :2 FTOH montrent une altération de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique à de nombreux niveaux chez les mâles et les femelles : augmentation de E2 et de la testostérone, induction de ERα et des vitellogénines. Chez les mâles, en cohérence avec l'augmentation de la testostérone, on note une augmentation de l'expression de la C17-stéroïde hydroxylase CYP17 et une diminution de l'aromatase (Liu et coll., 2009a). Une étude a montré en outre que le PFOS avait, à des doses de 160 mg/l, la capacité de déplacer les hormones stéroïdes de leurs protéines de transport sériques (Jones et coll., 2003). C'est particulièrement le cas, de façon étonnante, pour la cortisone et dans une moindre mesure pour les œstrogènes et la testostérone. En outre, le PFOS se fixe fortement à la BSA et sur d'autres albumines avec des concentrations saturantes de 50-100 mg/l. En conclusion, si l'étude de Ishibashi et coll. (2008) suggère un effet direct de certains PFC sur un ERα de poisson, ceci reste à confirmer avec d'autres méthodes et sur d'autres espèces.

De nombreuses études suggèrent, en cohérence avec ce qui a été montré chez les rongeurs, un effet via les PPAR, notamment PPARα. Dans une étude récente sur le medaka, Yang (2010) a montré que le PFOA n'induisait pas d'effet sur la taille de la gonade mâle mais induisait une augmentation de l'activité de l'acyl-CoA oxydase peroxysomale et de la catalase ainsi qu'une augmentation de l'expression de PPARα. Des effets sur l'expression des cytokines inflammatoires (IL6, IL1β, TNFα), compatibles avec un effet via PPARα, ont également été observés. Chez le saumon, une induction de l'expression des PPARs α, β et γ et de l'acyl-CoA oxydase par des doses de 6 mg/l de PFOS a été mise en évidence, ce qui renforce l'idée d'une modulation de ces récepteurs (Vatland et coll., 2008). Des effets similaires ont été observés chez plusieurs espèces de poissons (Oakes et coll., 2005) et notamment chez G*obiocypris rarus* où il semble que ce soit PPARg dont l'expression soit le plus induite par le PFOA (Liu et coll., 2009b ; Fang et coll., 2010). Plusieurs PPAR de poissons ont été clonés, notamment ceux de la plie (*Pleuronectes platessa*) et de la daurade (*Sparus auratus*). La caractérisation de ces PPAR montre que PPARγ a un patron d'expression plus étendu que ce qui

est connu chez les mammifères et surtout que sa pharmacologie est différente de celle des mammifères : de fait, aucun des ligands PPARγ sélectif connu n'active les PPAR de poissons (Leaver et coll., 2005). Ceci suggère que la transposition aux poissons des résultats concernant les effets des PFC chez les mammifères doit se faire avec précaution.

L'équipe de Bingsheng Zhou a publié plusieurs études établissant un lien entre le traitement au PFOS et la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes. En observant toute une gamme d'effets phénotypiques après traitement d'embryons de zebrafish à des doses de 0,1 à 1 mg/l, ces auteurs ont observé une augmentation de l'expression de *pax8* et *hhex*, deux gènes cruciaux pour le développement de la glande thyroïde (Shi et coll., 2008). Curieusement pour *pax8*, ces effets n'ont pas été observés à des doses plus fortes. Ceci suggère que le PFOS induit une différenciation de la glande thyroïde à des stades précoces chez l'embryon de zebrafish. Une étude plus récente a mis en évidence des effets complexes de PFOS (100 ou 200 µg/l) sur l'ensemble de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (Shi et coll., 2009). Une diminution de l'expression de certains gènes comme TSH, thyroglobuline, TTR ou TRα a été observée alors que d'autres gènes comme le CRF, les deiodinases 1, le transporteur NIS ou TRβ voient leur expression augmenter. Le taux de T4 n'est pas modifié chez ces poissons mais celui de T3 est augmenté, ce qui est compatible avec une activation de cette voie. Il reste à déterminer plus précisément si ces effets sont liés à une modulation directe d'un des acteurs de la voie thyroïdienne par les PFC.

Relation structure-fonction, études *in silico*

Au cours de ces dernières années, des articles sont apparus dans la littérature concernant l'étude de la toxicité des composés perfluorés par des méthodes SAR et QSAR. Les méthodes QSAR ont été en particulier appliquées à la modélisation de la toxicité sur deux espèces de rongeur, utilisant comme « *endpoints* » des données d'inhalation (LC_{50}, Bhhatarai et Grammatica, 2010), et à la modélisation des effets biologiques des PFC sur les cellules du carcinome du côlon (Kleszczynski et coll., 2007).

Il ne semble pas exister dans la littérature d'études dédiées aux relations entre la structure des PFC et leurs interactions avec les récepteurs endocriniens. Cette absence d'études pourrait être attribuée à la difficulté de trouver des bases de données expérimentales fiables sur les effets neurotoxiques et reprotoxiques.

En conclusion, si chez les poissons, trois voies de signalisation dépendant de la famille des récepteurs nucléaires des œstrogènes, des hormones thyroïdiennes et des PPAR ont été associées aux effets de PFC, chez l'Homme, les cibles principales semblent être les PPAR et parmi eux, PPARα et PPARγ. Il est encore trop tôt pour préciser les relations structure-activité de ces molécules.

Bibliographie

BHATARAI B, GRAMMATICA P. Per- and polyfluoro toxicity (LC50 inhalation) study in rat and mouse using QSAR modeling. *Chem Res Toxicol* 2010, **23** : 528-539

BJORK JA, WALLACE KB. Structure-activity relationships and human relevance for perfluoroalkyl acid-induced transcriptional activation of peroxisome proliferation in liver cell cultures. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 89-99

CHENG X, KLAASSEN CD. Perfluorocarboxylic acids induce cytochrome P450 enzymes in mouse liver through activation of PPAR-alpha and CAR transcription factors. *Toxicol Sci* 2008, **106** : 29-36

FANG X, WEI Y, LIU Y, WANG J, DAI J. The identification of apolipoprotein genes in rare minnow (Gobiocypris rarus) and their expression following perfluorooctanoic acid exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010, **151** : 152-159

FOREMAN JE, CHANG SC, EHRESMAN DJ, BUTENHOFF JL, ANDERSON CR, et coll. Differential hepatic effects of perfluorobutyrate mediated by mouse and human PPAR-alpha. *Toxicol Sci* 2009, **110** : 204-211

ISHIBASHI H, YAMAUCHI R, MATSUOKA M, KIM JW, HIRANO M, et coll. Fluorotelomer alcohols induce hepatic vitellogenin through activation of the estrogen receptor in male medaka (Oryzias latipes). *Chemosphere* 2008, **71** : 1853-1859

JONES PD, HU W, DE COEN W, NEWSTED JL, GIESY JP. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ Toxicol Chem* 2003, **22** : 2639-2649

KLESZCZYNSKI K, GARDZIELEWSKI P, MULKIEWICZ E, STEPNOWSKI P, SKŁADANOWSKI A. Analysis of structure-cytotoxicity in vitro relationship (SAR) for perfluorinated carboxylic acids. *Toxicology in Vitro* 2007, **21** : 1206-1211

LEAVER MJ, BOUKOUVALA E, ANTONOPOULOU E, DIEZ A, FAVRE-KREY L, et coll. Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology* 2005, **146** : 3150-3162

LIU C, DU Y, ZHOU B. Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes. *Aquat Toxicol* 2007, **85** : 267-277

LIU C, YU L, DENG J, LAM PK, WU RS, ZHOU B. Waterborne exposure to fluorotelomer alcohol 6:2 FTOH alters plasma sex hormone and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis of zebrafish. *Aquat Toxicol* 2009a, **93** : 131-137

LIU Y, WANG J, LIU Y, ZHANG H, XU M, DAI J. Expression of a novel cytochrome P450 4T gene in rare minnow (Gobiocypris rarus) following perfluorooctanoic acid exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009b, **150** : 57-64

OAKES KD, SIBLEY PK, MARTIN JW, MACLEAN DD, SOLOMON KR, et coll. Short-term exposures of fish to perfluorooctane sulfonate: acute effects on fatty acyl-coa oxidase activity, oxidative stress, and circulating sex steroids. *Environ Toxicol Chem*. 2005, **24** : 1172-1181

ROSEN MB, ABBOTT BD, WOLF DC, CORTON JC, WOOD CR, et coll. Gene profiling in the livers of wild-type and PPARalpha-null mice exposed to perfluorooctanoic acid. *Toxicol Pathol* 2008, **36** : 592-607

SHI X, DU Y, LAM PKS, WU RSS, ZHOU B. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Tox Applied Pharmacol* 2008, **230** : 23-32

SHI X, LIU C, WU G, ZHOU B. Waterborne exposure to PFOS causes disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere* 2009, **77** : 1010-1018. Erratum in : *Chemosphere* 2010, **81** : 821

SHIPLEY JM, HURST CH, TANAKA SS, DEROOS FL, BUTENHOFF JL, et coll. Transactivation of PPARalpha and induction of PPARalpha target genes by perfluorooctane-based chemicals. *Toxicol Sci* 2004, **80** : 151-160

TAKACS ML, ABBOTT BD. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 2007, **95** : 108-117

VANDEN HEUVEL JP, THOMPSON JT, FRAME SR, GILLIES PJ. Differential activation of nuclear receptors by perfluorinated fatty acid analogs and natural fatty acids : a comparison of human, mouse, and rat peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma, liver X receptor-beta, and retinoid X receptor-alpha. *Toxicol Sci* 2006, **92** : 476-489

VATLAND KRØVEL A, SØFTELAND L, TORSTENSEN B, OLSVIK PA. Transcriptional effects of PFOS in isolated hepatocytes from Atlantic salmon Salmo salar L. *Comp Biochem Physiol* C 2008, **148** : 14-22

WOLF CJ, TAKACS ML, SCHMID JE, LAU C, ABBOTT BD. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptor alpha by perfluoroalkyl acids of different functional groups and chain lengths. *Toxicol Sci* 2008, **106** : 162-171

YANG JH. Perfluorooctanoic acid induces peroxisomal fatty acid oxidation and cytokine expression in the liver of male Japanese medaka (Oryzias latipes). *Chemosphere* 2010, **81** : 548-552

ZHAO Y, TAN YS, HASLAM SZ, YANG C. Perfluorooctanoic acid effects on steroid hormone and growth factor levels mediate stimulation of peripubertal mammary gland development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 2010, **115** : 214-224

55
Conclusions et perspectives de recherche

Les « composés perfluorés » (PFC) se caractérisent par des propriétés à la fois hydrophobes et lipophobes. Ils sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles, notamment pour les traitements anti-taches et imperméabilisants de textiles (vêtements, tissus, tapis, moquettes…), les enduits résistants aux matières grasses pour les emballages en papier et/ou carton autorisés pour le contact alimentaire, les revêtements anti-adhésifs, les mousses anti-incendie, les tensioactifs utilisés dans l'exploitation minière et les puits de pétrole, les cires à parquet, ou encore certaines formulations d'insecticides. Les consommateurs des pays industrialisés sont aujourd'hui en contact avec ces composés dans leur vie quotidienne, à travers un grand nombre de produits manufacturés. Les PFC relargués dans l'environnement se retrouvent dans la chaîne alimentaire et *in fine* dans les organismes vivants. Le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), deux tensio-actifs organiques (per)fluorés, sont également les principaux produits de dégradation finaux de nombreux PFC. Ils sont retrouvés de façon prépondérante dans les matrices environnementales ou biologiques.

L'exposition aux PFC estimée varie de quelques ng à quelques dizaines de ng/kg/j. Ces valeurs apparaissent en deçà des limites tolérées pour l'adulte en population générale, mais restent questionnables pour des sous-populations particulièrement exposées (par exemple les forts consommateurs de poissons) et/ou à risque (fœtus, nourrisson…). La présence de plusieurs représentants de cette classe de polluants chimiques dans certains fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum, les teneurs observées sont de façon générale de l'ordre de quelques ng à quelques dizaines de ng/ml. Le PFOS et le PFOA apparaissent comme étant deux principaux biomarqueurs d'exposition aux PFC, et l'essentiel des études disponibles concernent l'un et/ou l'autre de ces deux composés. Les données portant sur d'autres représentants de cette catégorie de polluants sont beaucoup plus limitées, bien que quelques études mentionnent également certains composés pour lesquels les niveaux d'exposition et d'imprégnation rapportés justifieraient une caractérisation plus précise sur le plan toxicologique (par exemple le PFHxS ou le PFNA). Une tendance séculaire à la diminution de ces niveaux d'imprégnation en population générale est observée aux États-Unis depuis 2002, date correspondant à

l'arrêt de la production d'une des principales sociétés productrices. En revanche, l'absence de telles données concernant les autres pays ne permet pas de généraliser cette observation. L'existence d'une exposition fœtale aux PFC est démontrée, plusieurs études ayant fait état d'un transfert mère-fœtus via le sang du cordon. Toutefois, les niveaux de concentration rapportés dans le sang du cordon sont systématiquement inférieurs aux teneurs observées dans le sang maternel (d'un facteur 1,5 à 3,5). L'existence d'une exposition du nourrisson allaité via le lait maternel est de même démontrée, même si cette voie de transfert de la mère à l'enfant apparaît plus limitée que pour d'autres classes de polluants organiques halogénés tels que les dioxines, les PCB, ou les retardateurs de flamme bromés. Les demi-vies plasmatiques estimées pour le PFOS et le PFOA sont globalement de l'ordre de quelques heures chez le rongeur, quelques jours chez le primate et quelques années chez l'homme, ce qui en fait des polluants à la fois bioaccumulables mais moins persistants que d'autres substances plus lipophiles telles les dioxines ou les PCB. Par ailleurs, une importante variabilité inter- et intra-espèce est observée concernant les paramètres pharmacocinétiques de ces polluants. De même, ces paramètres varient selon le composé considéré, et en particulier selon la longueur de chaîne carbonée, les composés à plus longue chaîne présentant un caractère plus persistant. Les réactions de biotransformation (métabolisme) touchant les PFC semblent très limitées.

Le nombre d'études concernant les effets potentiels du PFOA et du PFOS sur la fonction de reproduction humaine est encore très limité. Comme c'est souvent le cas pour les premières études s'attachant à caractériser l'impact potentiel d'un composé qui constitue une préoccupation récente, celles-ci sont souvent de nature transversale, c'est-à-dire avec un dosage simultané des composés chimiques et des paramètres biologiques ou événements de santé d'intérêt. Cette approche est a priori plus sujette à des biais qu'une approche prospective. Cette limite est toutefois moins préoccupante dans le cas du PFOA et du PFOS, dont la demi-vie dans l'organisme est de plusieurs années, que pour d'autres composés moins persistants. Les études réalisées ont rapporté un effet possible des composés perfluorés (sans pouvoir l'attribuer spécifiquement au PFOS ou au PFOA) sur la fertilité des couples (augmentation du risque d'infécondité involontaire). Un effet sur la morphologie spermatique a été suggéré dans une unique étude humaine et appelle à de nouveaux travaux reposant sur une approche longitudinale. Pour les autres événements de santé faisant partie du champ de cette expertise, les études sont trop limitées pour indiquer un effet possible des composés perfluorés. Par ailleurs, un effet du PFOA sur le poids de naissance (ajusté sur l'âge gestationnel) peut être considéré comme plausible, à partir d'un petit nombre d'études de cohortes de taille et méthodologie satisfaisantes. S'agissant des études chez l'animal, la nature chimique des PFC semble être une variable importante dans la prise en compte des effets de ces substances. Un autre paramètre majeur est l'espèce (rat) ou la lignée de souris utilisée. Les effets potentiels des PFC sur la stéroïdogenèse mâle et femelle n'apparaissent pas modifier la fertilité des

animaux à des doses compatibles avec celles pouvant être observées chez l'être humain. Plus préoccupante, la modification de la sensibilité aux hormones stéroïdes décrite chez la femelle pourrait altérer le développement de la glande mammaire.

De façon générale, un manque de données peut être constaté, pour les composés perfluorés autres que le PFOS et le PFOA chez l'homme, tant en termes d'exposition, d'imprégnation, de métabolisme, pharmacocinétique, que de lien avec certains paramètres cliniques. En particulier, les précurseurs de type fluorotélomères, ou encore polyfluoroalkyl phosphate surfactants (PAPS) récemment mentionnés dans la recommandation 2010/161/EU de la Commission Européenne, sont des composés qui n'ont pas encore été étudiés sur le plan de l'évaluation du risque. Des études dédiées à ces substances perfluorées (formes précurseur et composés de substitution émergents) sont donc à initier dans tous ces domaines.

IX
Parabènes

Introduction

Les parabènes sont des esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, présentant un cycle benzénique substitué en para (en positions 1 et 4) par un groupement ester avec des chaînes alkyles de taille variable (figure 1). Les structures les plus courantes sont le 4-hydroxybenzoate de méthyle (méthyl parabène), d'éthyle (éthyl parabène), de propyle (propyl parabène), de butyle (butyl parabène), ou de benzyle (benzyl parabène).

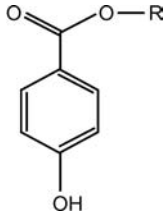


Figure 1 : Formule semi-développée des parabènes

R=CH3, Méthyl parabène; R=C2H5, Éthyl parabène; R=C3H7, Propyl parabène; R=C4H9, Butyl parabène; R=C6H5, Benzyl parabène

Certains parabènes, notamment le méthyl parabène, existent à l'état naturel à de faibles concentrations dans les aliments tels que la mûre, l'orge, la fraise, le cassis, la vanille, la carotte ou l'oignon. Dans le corps humain, ils sont des précurseurs du coenzyme Q10 (ubiquinone) (Whistance et coll., 1971). Ils ont une activité antibactérienne et antifongique ; l'activité est augmentée en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcool estérifié.

En raison de leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, les parabènes sont très largement utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments. Leur première utilisation en tant que conservateur remonte à 1920.

Les composés de la famille des parabènes les plus couramment utilisés comme additifs alimentaires sont : le méthyl parabène ou 4-hydroxybenzoate de méthyle (E218) et son sel de sodium (E219), l'éthyl parabène ou 4-hydroxybenzoate d'éthyle (E214) et son sel de sodium (E215). Leur emploi est régi par la Directive Européenne 95/2/CE du 20 février 1995.

Les parabènes les plus utilisés en cosmétique sont le méthyl parabène, l'éthyl parabène, le propyl parabène, le butyl parabène et l'isobutyl parabène. La directive 76/768/CEE du 27 septembre 1976 régit l'utilisation des parabènes dans les produits cosmétiques et fixe leur emploi à 0,4 % (en acide) pour un

ester et 0,8 % (en acide) pour les mélanges d'esters. Dans les médicaments, c'est le propyl parabène qui est principalement utilisé (tableau I).

L'association de méthyl parabène et de propyl parabène est présente dans plusieurs centaines de spécialités pharmaceutiques sous forme de base ou de sel sodique afin d'assurer la conservation alors que le butyl parabène et l'éthyl parabène ne sont présents que dans quelques spécialités. Il s'agit dans 70 % des cas de formes administrées par voie orale (formes liquides de type sirop ou solides de type comprimé) et 13 % de voies cutanées. Les concentrations efficaces utilisées dans les formes orales sont comprises entre 0,01 et 0,1 % en fonction du type de parabène.

Tableau I : Principaux usages des parabènes

Substances	Usages
Méthyl parabène	Additif alimentaire (E218) Cosmétique
Éthyl parabène	Additif alimentaire (E214) Cosmétique
Propyl parabène	Cosmétique Médicament
Isopropyl parabène	Additif alimentaire Cosmétique
Butyl parabène	Cosmétique
Isobutyl parabène	Cosmétique

Le tableau II présente les doses journalières tolérables définies par les agences sanitaires. Pour le méthyl parabène et l'éthyl parabène, une dose journalière tolérable (DJT) a été fixée à 10 mg/kg de poids corporel/jour (pc/j).

Tableau II : Dose journalière tolérable (DJT) des principaux parabènes

Évaluation de risques	**Voie d'exposition**	**Étude de référence**	**NOAEL** (mg/kg/j)	**DJT** (mg/kg/j)
DFVF *(Danish Institute for Food and Veterinary Research)*, 2004	Absorption per os Application dermique : 60 mg/j	Oishi, 2004 Test utérotrophique	1 000 (méthyl, éthyl) 750 (benzyl)	0-10 (méthyl+éthyl)
EFSA *(European Food Safety Authority)*, 2004	Absorption per os	Oishi, 2004 Oishi, 2002a	1 000 (méthyl, éthyl) LOAEL 10 (propyl)	0-10 (méthyl+éthyl) Non définie (propyl)

Bibliographie

DVVF (DANISH INSTITUTE OF FOOD AND VETERINARY RESEARCH). Department of Toxicology and Risk Assessment Note on Parabens in Food, Cosmetics and Consumer Products. September 2004

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to parahydroxybenzoates. *The EFSA Journal* 2004, **83** : 1-26

OISHI S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 2002a, **40** : 1807-1813

OISHI S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol* 2004, **42** : 1845-1849

WHISTANCE GR, FIELD FE, THRELFALL DR. Observations on the Biosynthesis of Ubiquinones by Animals. *European Journal of Biochemistry* 1971, **18** : 46–52

56
Exposition des populations

Du fait de leur emploi comme conservateurs dans plus de 80 % des produits cosmétiques (shampooings, crèmes hydratantes, mousses à raser...) et dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques, l'être humain est régulièrement exposé aux parabènes. De même, on peut retrouver dans l'alimentation, en tant qu'additifs alimentaires, le méthyl ou l'éthyl parabène.

Sources d'exposition et imprégnation des populations

Les données d'exposition aux parabènes sont limitées. Soni et coll. (2005) ont testé l'exposition aux parabènes de la population américaine. L'exposition toutes sources confondues a été estimée à 75,78 mg/j (ou 1,26 mg/kg/j pour un individu de 60 kg). Les cosmétiques représentaient environ 50 mg (basé sur une estimation de consommation de 5 g de produits contenant 10 g/kg de parabènes) et les produits pharmaceutiques pour 25 mg (basé sur une estimation de consommation de 5 g de médicaments contenant 5 g/kg de parabènes). Une estimation d'exposition par la voie alimentaire de 2,5 mg/personne était fondée sur la production industrielle, avec une forte marge d'incertitude. D'autres estimations ont été fournies par les auteurs (Soni et coll., 2005), basées sur la présence permanente des parabènes selon les catégories d'aliments, donnant des expositions potentielles aux États-Unis de 222 à 466 mg/j (soit moins de 8 mg/kg pour un individu de 60 kg).

La présence (mais non la gamme de concentrations) du méthyl parabène dans le sang de cordon et le lait maternel a été rapportée (Makino, 2003).

En 2004, la mise en évidence des cinq parabènes les plus utilisés (méthyl, éthyl, n-propyl, n-butyl et isobutyl parabènes) dans la graisse de carcinomes mammaires (Darbre et coll., 2004), a stimulé une discussion internationale (Flower, 2004 ; Harvey et Everett, 2004).

La quantification urinaire des parabènes (libres ou conjugués) a été proposée comme biomarqueur spécifique de leur exposition (Ye et coll., 2006). Calafat et coll. (2010) ont étudié l'exposition au méthyl, éthyl, propyl, et butyl parabènes dans un échantillon représentatif de la population générale des États-Unis (personnes âgées de 6 ans et plus) entre 2005 et 2006. L'analyse a porté sur 2 548 échantillons urinaires. Le méthyl parabène et le propyl parabène ont été détectés dans 99,1 % et 92,7 % des échantillons respectivement,

l'éthyl dans 42,4 % et le butyl dans 47 %. La concentration médiane du méthyl parabène était de 63,5 µg/l et celle du propyl parabène de 8,7 µg/l. Les adolescentes et les femmes adultes avaient des concentrations significativement plus fortes que les adolescents et hommes adultes.

Récemment, Frederiksen et coll. (2010) ont mesuré les concentrations de 5 parabènes (méthyl, éthyl, propyl, butyl et benzyl parabènes) dans l'urine, le plasma et le liquide séminal de 60 hommes danois en bonne santé. Ils ont mis en évidence la présence du méthyl, éthyl, propyl et butyl parabène respectivement dans 98, 80, 98 et 83 % des échantillons urinaires (médianes respectivement 17,7 ; 1,98 ; 3,60 ; 0,19 µg/l) ; le benzyl parabène n'était détecté que dans 7 % des échantillons. Le méthyl et le propyl parabènes étaient détectés dans la majorité des échantillons de plasma et de liquide séminal (médianes dans le plasma : 1,53 et 0,32 µg/l ; dans le liquide séminal : 1,99 et 0,68 µg/l, respectivement pour ces 2 parabènes).

Les concentrations urinaires du butyl, éthyl, méthyl et propyl parabènes ont été mesurées dans les échantillons urinaires de 191 femmes enceintes de la cohorte Eden (*Etude du DEveloppement des Nouveau-nés*) recrutées en 2002-2006 à Nancy et Poitiers (Rémy Slama, communication personnelle). Les résultats sont présentés dans le tableau 56.I.

Tableau 56.I : Concentrations urinaires de quelques parabènes chez 191 femmes enceintes de la cohorte Eden en France

	Concentrations brutes (µg/l)			Concentrations divisées par la créatinine (µg/g cr)		
Parabène	Médiane	25th	75th	Médiane	25th	75th
Butyl parabène	1,7	0,20	8,3	1,4	0,28	8,0
Éthyl parabène	4,1	0,71	13,9	3,5	0,81	13,3
Méthyl parabène	97,8	34,70	280,0	102,9	33,20	279,6
Propyl parabène	12,5	3,50	46,5	11,7	3,00	51,1

Schlumpf et coll. (2010) ont recherché la présence de parabènes dans le lait maternel pour 3 cohortes (2004, 2005, 2006) d'un total de 54 couples mères-enfants. Le méthyl, éthyl et propyl parabènes non conjugués ont été détectés dans 15 à 34 % des échantillons de lait dégraissé (moyenne respectivement : 2,18, 1,26 et 1,42 µg/l). Le butyl parabène était non détectable. Les auteurs suggèrent que les parabènes les plus lipophiles comme le butyl parabène sont associés principalement aux lipides du lait.

L'estimation de l'exposition via les cosmétiques n'a pas été finalisée, à ce jour, par le comité scientifique SCCS (*Scientific Committee on Consumer Products*). La méthodologie classique d'estimation par la somme des expositions possibles par type de produits est discutée par Cowan-Ellsberry et Robison (2009). Les auteurs ont estimé l'exposition via les cosmétiques à 1,26 mg/kg

pc/j, en considérant l'ensemble des parabènes et les fréquences d'utilisation des produits.

Toxicocinétique

La plupart des résultats des études citées ci-dessous ont été analysés dans les rapports du JECFA, Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JEFCA, 1966), du SCF (Comité scientifique de l'alimentation humaine) (SCF, 1994), de l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) (EFSA, 2004), du NTP (Programme National de Toxicologie américain) (NTP, 2005), et du CIR (*Cosmetic Ingredient Review*, le Comité d'examen des ingrédients cosmétiques américain) (CIR, 2008). La revue de Darbre et Harvey (2008) met également en lumière certains aspects de la pénétration cutanée des parabènes.

Administration par voie orale

Études chez l'animal

Dans la littérature, quatre espèces animales ont servi à l'étude toxicocinétique (ADME[28]) des parabènes (rat, chien, chat et lapin). Par voie orale, l'absorption des parabènes est rapide et importante (jusqu'à 94 % de la dose est excrétée dans l'urine). Ils sont très rapidement métabolisés puisque les composés parents se retrouvent à des niveaux négligeables dans le sang et que divers métabolites sont présents dans l'urine dans l'heure suivant l'administration.

Quelle que soit l'espèce étudiée, la métabolisation des parabènes aboutit à l'hydrolyse de ces derniers en acide para-hydroxybenzoïque (PABA) qui est le métabolite principal (figure 56.1). Ce métabolite peut être ensuite conjugué notamment avec la glycine, l'acide glucuronique ou le sulfate pour former l'acide para-hydroxyhippurique, le glucuronide para-hydroxybenzoïque ou le sulfate para-carboxyphényle.

La métabolisation des parabènes ainsi que leur élimination sont rapides et quasiment totales par voie orale. Chez la femelle gestante, l'éthyl et le butyl parabènes peuvent se concentrer (jusqu'à 10 fois) dans le liquide amniotique (Frederiksen et coll., 2008).

28. Sigle désignant quatre processus en pharmacocinétique : absorption, distribution, métabolisme et élimination

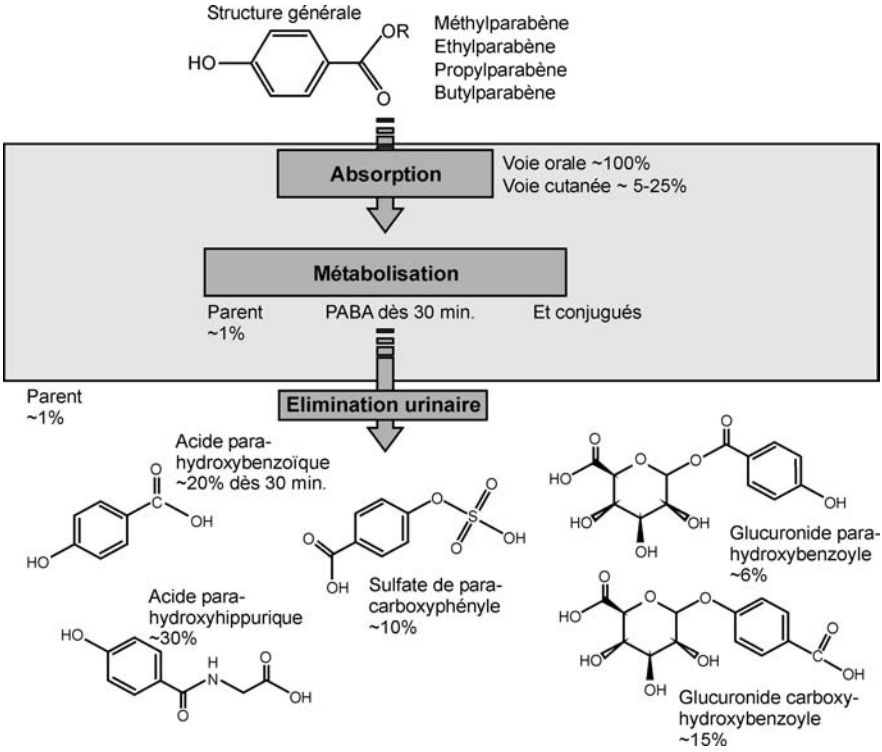


Figure 56.1 : Schéma métabolique indicatif, d'après les données chez les animaux de laboratoire

Études chez l'Homme

Le faible nombre d'études réalisées chez l'Homme par voie orale (Jones et coll., 1956 ; Heim et coll., 1960) montre des résultats similaires à ceux observés chez les animaux de laboratoire. L'administration par voie orale de méthyl parabène ou d'éthyl parabène donne lieu à une absorption rapide, une métabolisation importante et rapide et une forte excrétion. En effet, le parent est retrouvé à des niveaux négligeables dans le sang et le métabolite principal est détecté 3 minutes après l'absorption. Parmi les métabolites urinaires (>50 % de la dose après 12 h), l'acide para-hydroxybenzoïque est majoritaire.

Administration par voie cutanée

Études chez l'animal

La plupart des études d'ADME ont utilisé le rat comme modèle. Or, de récentes données ont montré des différences dans les capacités métaboliques des peaux d'homme et de rat, qui remettraient en cause ce modèle dans

l'étude de l'absorption des parabènes par voie cutanée. Le mini-porc apparaît comme une alternative plus pertinente. Jewell et coll. (2007) ont comparé le métabolisme cutané de la peau humaine à celui de la peau de mini-porc. Les auteurs ont montré que malgré certaines différences physiologiques, notamment au niveau des carboxylestérases, l'hydrolyse des parabènes était similaire entre la peau humaine et celle du mini-porc. Les estérases de la peau hydrolysent les parabènes en acide para-hydroxybenzoïque.

Ishiwatari et coll. (2007) ont étudié l'absorption cutanée du méthyl parabène à travers la peau de mini-porc Yucatan (où les couches de graisse ont été retirées) montée sur une cellule de diffusion. Une solution contenant le méthyl parabène a été déposée sur chaque échantillon de peau ; des prélèvements ont été réalisés 15, 60 et 120 minutes après l'application cutanée. Les concentrations de méthyl parabène augmentent au cours du temps dans le stratum corneum ; ces concentrations augmentent globalement dans l'épiderme de 15 à 60 minutes après l'application puis diminuent à 120 minutes. En revanche, dans le derme, les concentrations de méthyl parabène augmentent très légèrement à 15 et 60 minutes, et restent constantes entre 60 et 120 minutes.

Études chez l'Homme

Fischmeister et coll. (1975) ont étudié l'absorption des parabènes après application cutanée d'une crème chez 3 volontaires. Une heure après l'application, les parabènes ont été détectés au niveau cutané mais 8 heures après l'application, ils ne l'étaient plus.

Ishiwatari et coll. (2007) ont mené une étude chez des volontaires japonais (hommes et femmes) où les niveaux de méthyl parabène ont été dosés dans le stratum corneum à différents temps (1, 2, 5 et 12 heures), soit après application unique d'une crème contenant 0,15 %, 0,25 % ou 0,5 % de méthyl parabène, soit après application d'une crème deux fois par jour pendant un mois. Après une seule application, le méthyl parabène a été retrouvé dans le stratum corneum une à deux heures après l'application ; aucune trace de méthyl parabène n'a été détectée 12 heures après l'application. Deux applications par jour pendant un mois ont résulté en une augmentation de la concentration de méthyl parabène dans le stratum corneum.

El Hussein et coll. (2007) ont étudié l'absorption des méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes *in vitro* sur peau humaine. Une lotion commerciale (contenant les quatre parabènes à différentes concentrations) a été appliquée pendant 24 h. Les quatre parabènes diffusent d'autant mieux dans le fluide récepteur qu'ils sont peu lipophiles, et que la chaîne est courte (méthyl, éthyl, propyl, butyl parabènes : 18 %, 14 %, 9 %, 2 %). En outre, l'absorption augmente avec des doses répétées.

La confirmation de la capacité des parabènes d'être absorbés systématiquement à partir d'applications topiques a été démontrée récemment (Janjua

et coll., 2008) : après application topique d'une crème cosmétique contenant 2 % de butyl parabène, chez 26 hommes jeunes, les taux ont augmenté dans le sang et l'urine : le n-butyl parabène était détecté dans le sérum en 1 h et dans l'urine avec un pic à 8-12 h, dont la majorité conjuguée sous forme de glucuronide.

Lobemeier et coll. (1996) ont étudié l'hydrolyse des parabènes en acide para-hydroxybenzoïque par des extraits provenant de différentes couches de la peau. Des extraits ont été préparés à partir de peau humaine (abdominale) en séparant l'épiderme, la graisse sous-cutanée, et la couche basale. Des kératinocytes en culture ont servi également à préparer un extrait. Dans l'extrait de la graisse sous-cutanée, la plus forte hydrolyse des 4 parabènes a été observée, l'activité diminuant avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée. En revanche, pour les kératinocytes, l'activité d'hydrolyse augmentait avec la longueur de la chaîne carbonée. Les auteurs ont ensuite isolé l'activité enzymatique de chaque extrait. Dans la graisse sous-cutanée, l'activité de la carboxylestérase de type B est différente selon le type de parabène. L'activité est maximale avec le méthyl parabène et elle diminue avec l'augmentation de la chaîne carbonée jusqu'au butyl parabène. Une seconde carboxylestérase de type B dans la graisse sous-cutanée et une troisième au niveau des kératinocytes ont été identifiées, plus active avec le butyl parabène. Cette étude suggère que les carboxylestérases des kératinocytes sont suffisantes pour hydrolyser complètement les traces de parabènes qui pourraient entrer dans la peau à partir de crèmes.

Les résultats obtenus sur peau humaine sont très différents de ceux trouvés chez le rat ; seuls 35 % (méthyl parabène) et 33 % (butyl parabène) sont métabolisés. La dose absorbable représente 85±15 % et 81±11 % (respectivement) de la dose appliquée. Ces résultats suggèrent d'une part une plus forte absorption par la peau humaine, et d'autre part une plus forte métabolisation dans la peau de rat, suggérant davantage de composé parent biodisponible chez l'Homme.

Harville et coll. (2007) ont obtenu des conclusions similaires. *In vitro*, les profils d'hydrolyse des 4 parabènes étudiés ont été fort différents entre une suspension cellulaire provenant de peau humaine et une suspension cellulaire de peau de rat. L'hydrolyse au niveau la peau humaine est 3 à 4 fois moins efficace que celle réalisée au niveau de la peau de rat, posant ainsi la question de la pertinence de l'extrapolation à l'homme de résultats obtenus sur la peau de rat. Par ailleurs, les estérases des deux espèces semblent avoir des spécificités de substrat différentes : les préparations de peaux de rat hydrolysent d'autant mieux les parabènes que la chaîne de l'ester est longue, alors que l'hydrolyse par la peau humaine est meilleure sur les parabènes à chaîne courte. Ce fait a été confirmé par Prusakiewicz et coll. (2006) qui ont observé de très grandes différences d'activité des estérases entre la peau de rat et la peau humaine.

L'influence des autres composants des cosmétiques doit également être mentionnée : ainsi, l'éthanol peut inhiber l'activité des estérases *in vitro*, augmenter la pénétration du méthyl parabène dans la peau de cobaye et induire la conversion par transestérification du méthyl parabène en butyl parabène. Enfin, les parabènes sont souvent utilisés en association en raison de leur effet synergique antibactérien (par exemple méthyl+propyl). Caon et coll. (2010) ont étudié le flux dermique de ces combinaisons dans un modèle *in vitro* d'oreille de porc : individuellement, la solubilité et la lipophilicité des molécules rendent compte de l'absorption transcutanée (méthyl parabène>éthyl parabène>propyl parabène>butyl parabène). La combinaison du propyl avec les autres parabènes réduit leur flux (environ 2 fois pour le méthyl et le butyl, et 8 fois pour l'éthyl) peut-être en relation avec une rétention dans l'épiderme et le derme.

En conclusion, les données d'exposition humaine aux parabènes sont limitées ; une étude récente (2010) menée chez les hommes danois montre la présence des 4 parabènes (méthyl, éthyl, propyl, butyl parabènes) dans le plasma et le liquide séminal. De même, une étude française dans une cohorte de femmes enceintes révèle la présence de méthyl, éthyl, propyl, butyl parabènes dans l'urine et des taux urinaires de méthyl parabène proches de 100 µg/l.

La plupart des études toxicocinétiques par voie cutanée ont utilisé le rat comme modèle. Les données sont à utiliser avec précaution, en raison de la différence de métabolisme mise en évidence : les estérases de la peau hydrolysent les parabènes en acide para-hydroxybenzoïque, avec une efficacité et une spécificité de substrat différentes dans l'espèce humaine qui laisserait davantage de composés parents biodisponibles.

Bibliographie

CALAFAT AM, YE X, WONG LY, BISHOP AM, NEEDHAM LL. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 679-685

CAON T, COSTA AC, DE OLIVEIRA MA, MICKEGA, SIMÕES CM. Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. *Int J Pharm* 2010, **391** : 1-6

CIR. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxico,* 2008, **27 (Suppl 4)** : 1-82

COWAN-ELLSBERRY CE, ROBISON SH. Refining aggregate exposure: example using parabens. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009, **55** : 321-329

DARBRE PD, ALJARRAH A, MILLER WR, COLDHAM NG, SAUER MJ, et coll. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol* 2004, **24** : 5-13

DARBRE PD, HARVEY PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol* 2008, **28** : 561-578

EFSA.Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E 214-219). *EFSA Journal* 2004, **83** : 1-26

EL HUSSEIN S, MURET P, BERARD M, MAKKI S, HUMBERT P. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis-dermis layers (ex-vivo study). *Exp Dermatol* 2007, **16** : 830-836

FISCHMEISTER I, HELLGREN L, VINCENT J. Infrared spectroscopy for tracing of topically applied ointment vehicles and active substances on healthy skin. *Arch Dermatol Res* 1975, **253** : 63-69

FLOWER C. Observations on the paper by Darbre et coll. (2204). *J Appl Toxicol* 2004, **24** : 304-305

FREDERIKSEN H, TAXVIG C, HASS U, VINGGAARD AM, NELLEMANN C. Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicol Sci* 2008, **106** : 376-383

FREDERIKSEN H, JØRGENSEN N, ANDERSSON AM. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010, Mar 10

HARVEY PW, EVERETTDJ. Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *J Appl Toxicol* 2004, **24** : 1-4

HARVILLE HM, VOORMAN R, PRUSAKIEWICZ JJ. Comparison of paraben stability in human and rat skin. *Drug Metab Lett* 2007, **1** : 17-21

HEIM F. Die pharmakologisch-toxikologische PrÜfung von chemischen Zusatzsoffen zur Nahrung. *Physik-Med/ Soz Erlangen* 1960, **81** : 14-18

ISHIWATARI S, SUZUKI T, HITOMI T, YOSHINO T, MATSUKUMA S, TSUJI T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol* 2007, **27** : 1-9

JANJUA NR, FREDERIKSEN H, SKAKKEBAEK NE, WULF HC, ANDERSSON AM. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int J Androl* 2008, **31** : 118-130

JECFA. Benzoate, methyl, ethyl, propylbutyl hydroxy, p- (FAO Nutrition Meetings Report Series 40abc). 1966

JEWELL C, PRUSAKIEWICZ JJ, ACKERMANN C, PAYNE NA, FATE G, et coll. Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicol Appl Pharmacol,* 2007, **225** : 221-228

JONES PS, THIGPEN D, MORRISON JL, RICHARDSON AP. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 1956, **45** : 265-273

LOBEMEIER C, TSCHOETSCHEL C, WESTIE S, HEYMANN E. Hydrolysis of parabenes by extracts from differing layers of human skin. *Biol Chem* 1996, **377** : 647-651

MAKINO T. Female reproductive tract and mammary disorders caused by endocrine disruptor. *Jpn Med Assoc J* 2003, **46** : 93-96

NTP. Butylparaben: Review of Toxicological Literature. 2005

PRUSAKIEWICZ JJ, ACKERMANN C, VOORMAN R. Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm Res* 2006, **23** : 1517-1524

SCF. Reports of the Scientific Committee for Food, Thirty-fifth series. 1994

SCHLUMPF M, KYPKE K, WITTASSEK M, ANGERER J, MASCHER H, MASCHER D, VÖKT C, BIRCHLER M, LICHTENSTEIGER W. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere* 2010, **81** : 1171-1183

SONI MG, CARABIN IG, BURDOCK GA Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol* 2005, **43** : 985-1015

YE X, BISHOP AM, REIDY JA, NEEDHAMLL, CALAFAT AM. Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environ Health Perspect* 2006, **114** : 1843-1846

57
Études épidémiologiques

Peu d'études chez l'homme existent à ce jour, en particulier du fait du développement récent des méthodes de dosages chimiques des parabènes dans les matrices biologiques. Deux études (Mirick et coll., 2002 ; McGrath, 2003) ont estimé l'exposition par un questionnaire rétrospectif présentant ainsi quelques limites. Une seule étude récente (Meeker et coll., 2010) propose d'estimer l'exposition par un dosage de biomarqueurs, qui doit cependant être interprétée avec prudence compte tenu de la nature peu persistante dans l'organisme humain des métabolites des parabènes et de la fenêtre d'exposition biologiquement pertinente pour l'effet étudié.

Effets sur la fonction de reproduction masculine

Une étude récente (Meeker et coll., 2010) a étudié les taux urinaires de méthyl, propyl, butyl parabènes chez une centaine d'hommes consultant pour infertilité et analysé les relations avec les taux sériques d'hormones et les paramètres du sperme ainsi que les dommages de l'ADN des spermatozoïdes (essai de la comète). Dans les échantillons d'urine, 100 % contenaient du méthyl, 92 % du propyl et 32 % du butyl parabène. Aucune relation n'était observée entre le méthyl ou le propyl et les paramètres testés. En ce qui concerne le butyl parabène, sa présence est significativement (p=0,03) associée aux dommages de l'ADN, et une relation dose dépendante est positivement observée avec la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Effets sur la fonction de reproduction féminine

Un débat scientifique (Harvey et Darbre, 2004 ; Namer et coll., 2008) et sociétal existe concernant l'effet possible de certains composés de la famille des parabènes utilisés en application cutanée locale sous les aisselles, notamment du fait de leur présence dans les déodorants, sur le risque de survenue de cancer du sein. Il convient en principe de distinguer cette question de celle de l'impact éventuel des sels d'aluminium ou d'autres composés présents dans les déodorants ou crèmes épilatoires, ou de celle des composés œstrogéniques ou

des perturbateurs endocriniens en général, dont les parabènes ne constituent qu'une famille. Cette distinction n'est pas toujours aisée à faire dans les études épidémiologiques.

Mirick et coll. (2002) ont réalisé une étude cas-témoins sur les cas incidents, femmes âgées de 20 à 74 ans lors du diagnostic, recrutées entre 1992 et 1995 dans la région de Seattle, État de Washington, aux État-Unis. Les témoins ont été identifiés et recrutés par génération aléatoire de numéros de téléphones dans la zone de recrutement des cas, et appariés sur l'âge (793 témoins et 810 cas). L'exposition a été estimée à partir d'un questionnaire aux cas et témoins sur l'utilisation de déodorants et de produits anti-transpirants ainsi que sur l'épilation des aisselles ; les auteurs ne précisaient pas si ce questionnaire se rapportait à la période de l'entretien ou concernait une période antérieure préalable au diagnostic. Plus de 90 % des cas et des témoins rapportaient une épilation régulière des aisselles, et les analyses ont été restreintes à ces sujets. L'usage régulier d'un anti-transpirant était associé à un *odds-ratio* de cancer du sein de 0,9 (IC 95 % : 0,7 à 1,1), ainsi que l'usage régulier d'un anti-transpirant dans l'heure suivant l'épilation (OR=0,9 ; IC 95 % : 0,7 à 1,1 aussi). Si on suppose une absence totale de biais, cette analyse indique que l'utilisation régulière d'un anti-transpirant (sans référence à sa composition) a peu de chances d'être associée à une augmentation du risque de cancer du sein supérieure à 10 %. L'*odds-ratio* de cancer du sein associé à l'utilisation d'un déodorant était de 1,2 (IC 95 % : 0,9 à 1,5), et l'intervalle de confiance était similaire pour l'OR associé à l'utilisation régulière de déodorant dans l'heure suivant l'épilation. En supposant là encore une absence totale de biais, l'étude indique que l'utilisation de déodorant était peu susceptible d'être associée à une augmentation du risque de cancer du sein supérieure à 50 %.

La principale limitation de cette étude réalisée sur un échantillon de population relativement important concerne l'estimation rétrospective de l'exposition, sans information. On peut demander aux sujets de décrire la situation plusieurs années avant l'entretien, mais la qualité de la mémorisation mérite d'être validée, et on ne peut exclure, au moins pour les études réalisées après le début des controverses publiques, que l'effort de mémorisation des cas soit plus important que celui des témoins. De plus, l'estimation de l'exposition a été réalisée sans quantifier la fréquence d'utilisation des déodorants et anti-transpirants, et sans préciser de référence à une période d'exposition particulière (par exemple, cinq ou dix ans avant la survenue de la maladie) ; en outre, des données sur la composition des anti-transpirants et déodorants utilisés aux États-Unis dans les années 1970 à 1990 seraient utiles pour discuter la pertinence de l'étude par rapport à la problématique des parabènes. En faisant abstraction de ces limitations potentielles, cette étude indique que les produits déodorants ou anti-transpirants utilisés aux États-Unis au début des années 1990 (ou auparavant, en supposant que l'exposition rapportée par

le questionnaire en soit un bon indicateur) sont peu susceptibles d'être associés avec une augmentation forte (doublement du risque ou davantage) du risque de cancer du sein.

Une autre étude a été publiée par McGrath (2003). Elle rapporte des données globales sur l'évolution d'une part de l'incidence du cancer du sein et d'autre part sur la vente de déodorants et d'anti-transpirants aux États-Unis entre 1940 et 2000. Les deux évolutions sont parallèles, mais le niveau de preuve apporté par une étude écologique de ce type est généralement considéré comme très limité. L'étude rapporte par ailleurs une analyse réalisée auprès d'une série de cas de cancer du sein diagnostiqués dans deux hôpitaux de Chicago entre 1993 et 2001. L'objectif était de mettre en relation l'âge au diagnostic de la maladie avec la fréquence d'utilisation de déodorants, d'anti-transpirants, ou la fréquence de l'épilation des aisselles. Les patientes avaient la consigne de vérifier les étiquettes de leur déodorant actuel pour permettre la distinction entre déodorant, anti-transpirant, ou un produit associant les deux. Elles ont été catégorisées en quatre groupes, selon la fréquence d'utilisation, en combinant les informations sur fréquence de l'épilation sous les bras et usage de déodorant/anti-transpirant. Parmi les 1 344 cas identifiés, 437 ont participé. Des informations sur différentes caractéristiques sociodémographiques ou liées à la vie reproductive et pouvant être associées au cancer du sein ont été recueillies, mais toutes les analyses statistiques ont été réalisées sans ajustement. L'âge moyen au diagnostic du cancer du sein était le plus élevé dans le groupe de femmes n'utilisant pas de déodorant ni d'anti-transpirant, et il diminuait avec la fréquence d'utilisation des déodorants/anti-transpirants ou de l'épilation. Parmi les utilisatrices de déodorants/anti-transpirants, celles ayant débuté leur utilisation avant l'âge de 16 ans avaient un âge au diagnostic du cancer inférieur de 9,6 ans en moyenne en comparaison des femmes ayant débuté l'âge des déodorants/anti-transpirants après l'âge de 16 ans ($p<0,0001$).

L'interprétation de cette étude est rendue très difficile du fait de l'utilisation d'un protocole original, et problématique dans le contexte où il existe des variations importantes dans la fréquence d'utilisation des déodorants au cours de la seconde moitié du XXe siècle. En effet, il est probable que le fait de commencer à utiliser des déodorants avant l'âge de 16 ans constitue une pratique plus fréquente chez les femmes nées dans la seconde moitié du XXe siècle que dans la première moitié du XXe siècle. Or, le fait que le diagnostic des cas ait eu lieu entre 1993 et 2001 entraîne une troncature dans l'âge au diagnostic du cancer chez les femmes nées dans la seconde moitié du XXe siècle, femmes qui ne peuvent du fait du protocole de l'étude être âgées de plus de 51 ans lors du diagnostic. Ce phénomène est moins marqué chez les femmes nées dans la première moitié du siècle, dont certaines ont pu avoir un cancer à l'âge de 60 ou 70 ans et être recrutées dans l'étude. Dans ces conditions de tendances temporelles dans l'utilisation des déodorants et de troncature de l'âge au diagnostic du cancer, un biais donnant l'impression que les cas

qui ont commencé jeunes à utiliser des déodorants ont un âge au diagnostic plus précoce que les cas ayant commencé plus tardivement est tout à fait plausible, et pourrait expliquer tout ou partie de l'association observée. Une autre limite de l'étude est l'absence d'estimation du taux de participation ; on peut penser que le fait qu'environ un tiers seulement des questionnaires envoyés aient été renseignés et retournés soit lié au fait qu'une certaine proportion des cas étaient décédés ou avaient déménagé au moment de l'étude, mais l'article ne permet pas de préciser ce point, et donc de discuter clairement les biais de sélection éventuels liés à la non-participation. Du fait de ces limites, et en l'absence d'analyses statistiques plus poussées, on ne peut pas considérer cette étude comme réellement informative par rapport à la question posée.

En conclusion, les données épidémiologiques concernant l'impact possible d'une exposition aux parabènes sur la qualité spermatique sont à ce jour insuffisantes. De même, on peut considérer que deux études épidémiologiques (Mirick et coll., 2002 ; McGrath, 2003) apportent peu d'éléments concernant l'impact possible des parabènes présents dans les déodorants ou anti-transpirants sur la survenue de cancer du sein. Elles ne permettent ni d'écarter clairement cet impact, ni de lui apporter de la plausibilité.

Bibliographie

HARVEY PW, DARBRE P. Endocrine disrupters and human health: could œstrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? *J Appl Toxicol* 2004, **24** : 167-176

MCGRATH KG. An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. *Eur J Cancer Prev* 2003, **12** : 479-485

MEEKER JD, YANG T, YE X, CALAFAT AM, HAUSER R. Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage. *Environ Health Perspect* 2010, Sep 28

MIRICK DK, DAVIS S, THOMAS DB. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002, **94** : 1578-1580

NAMER M, LUPORSI E, GLIGOROV J, LOKIEC F, SPIELMANN M. The use of deodorants/antiperspirants does not constitute a risk factor for breast cancer. *J Bull Cancer* 2008, **95** : 871-880

58
Études chez l'animal

Les études de toxicologie, peu nombreuses, ont été menées chez le rat ou la souris. Elles portent sur les méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes le plus souvent. L'administration est effectuée par voie orale ou par voie sous-cutanée. Le nombre d'études par voie sous-cutanée est plus important pour la femelle.

Études chez le mâle

Les études démontrant des effets délétères chez l'animal mâle après administration par voie orale proviennent d'un seul groupe. Les effets observés portent sur les paramètres spermatiques et les taux d'hormones.

Méthyl et éthyl parabènes

En 2004, Oishi a étudié les fonctions reproductives mâles de jeunes rats Wistar (25-27 jours) exposés par l'alimentation au méthyl ou à l'éthyl parabène à environ 10 et 1 000 mg/kg/j (3 groupes de 8 rats). Aucun effet n'a été observé sur les poids des organes reproducteurs, le nombre des spermatozoïdes, les concentrations sériques en LH, FSH et testostérone.

Dans une étude chez le rat Wistar, après exposition des mères du 7e au 21e jour de gestation à 100, 200 ou 400 mg/kg pc/jour d'éthyl parabène par voie sous-cutanée, aucune toxicité chez les mères ni chez la descendance n'est observée. Les taux plasmatiques de progestérone, 17-alpha-hydroxyprogestérone, T3 et T4 ne sont pas modifiés chez les mères. On n'observe pas de modification des taux plasmatiques de T4, progestérone et testostérone chez les fœtus, ni des taux testiculaires de progestérone et testostérone, ni des poids des organes reproducteurs des fœtus (Taxvig et coll., 2008).

Récemment, une étude menée par un consortium industriel et visant à reproduire l'étude d'Oishi selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (Hoberman et coll., 2008) a confirmé l'absence d'effet sur les organes reproducteurs mâles après administration de méthyl parabène par voie orale chez le rat juvénile.

Propyl et butyl parabènes

Propyl parabène

Une étude menée par Oishi en 2002 chez le rat juvénile (21 jours), exposé par l'alimentation (sans phyto-œstrogènes) à environ 10, 100 ou 1 000 mg/kg pc/jour de propyl parabène pendant 4 semaines, 8 animaux par groupe, a mis en évidence un effet sur la spermatogenèse sans altération de poids des organes reproducteurs. Les auteurs ont observé une diminution de la quantité testiculaire et épididymale de spermatozoïdes (environ 50 % des témoins à la plus forte dose) ; la production journalière de spermatozoïdes était diminuée dans tous les groupes (environ 70 % des témoins) et une diminution dose dépendante de la concentration sérique en testostérone était également notée (Oishi et coll., 2002a). Cette étude n'a pas permis à l'EFSA d'identifier de NOAEL. L'étude, non menée selon les BPL, a été critiquée dans de nombreuses évaluations effectuées par des agences sanitaires, en particulier en raison du faible nombre d'animaux utilisés, du manque de détails fournis, de variations importantes dans les poids des animaux, dans les dosages hormonaux (SCCP, 2006). De plus, il est à noter que la durée de l'étude ne couvre pas un cycle complet de spermatogenèse (52 jours chez le rat), ce qui laisse envisager qu'au cours d'une étude plus longue, les effets pourraient être plus prononcés.

Aucune donnée n'a depuis remis en cause la toxicité du propyl parabène. Une étude en cours (Afssaps) sur le rat juvénile, reproduisant les conditions de l'étude d'Oishi, selon les BPL, avec un nombre supérieur d'animaux, un niveau de dose et des critères d'évaluation supplémentaires devrait permettre de préciser la toxicité du propyl parabène sur les organes reproducteurs mâles pendant la période pré-pubère et de déterminer une dose sans effet.

Butyl parabène

Plusieurs études ont été menées pour étudier la toxicité après exposition au butyl parabène *in utero*. L'exposition de rate Sprague-Dawley du 6e au 19e jour de gestation, à 10, 100 ou 1 000 mg/kg/jour de butyl parabène par voie orale, n'entraîne aucune toxicité sur le développement (Daston, 2004). De même, l'exposition de rates gestantes du 7e au 21e jour de gestation, à 100, 200 ou 400 mg/kg/j de butyl parabène par voie sous-cutanée, ne conduit à aucune toxicité sur le développement (Taxvig et coll., 2008). Aucune NOAEL n'a pu être clairement identifiée. Enfin, dans une étude chez la rate gestante (Sprague-Dawley) du 6e jour de gestation au 20e jour après la naissance, après administration de 100 et 200 mg/kg pc/j par voie sous-cutanée, une modification de la spermatogenèse des mâles de la génération F1 est observée aux deux doses, avec diminution du nombre de spermatozoïdes, de la motilité et du nombre de cellules aux stades différenciés (Kang et coll., 2002). Le poids des testicules, des vésicules séminales et de la prostate, était significativement diminué à 49 jours postnatals (mais non à 70 et 90 jours) et pour 100 mg/kg/j

uniquement. La proportion de petits vivants à la naissance ou survivants au sevrage est diminuée à la forte dose. L'expression testiculaire de l'ARNm des récepteurs aux œstrogènes était augmentée à 90 jours postnatals pour le groupe 200 mg/kg/j. Le nombre d'animaux est limité (25 animaux par groupe).

Dans son avis de 2005, le SCCP mentionnait une NOAEL de 2 mg/kg/j pour le butyl parabène, sur la base d'une étude courte par voie sous-cutanée (Fisher et coll., 1999). Dans cette étude, des rats Wistar recevaient 2 mg de butyl parabène par voie sous-cutanée du 2e au 18e jours postnatals. L'examen avait lieu aux jours 18, 25, 35 et 75. Aucune anomalie du poids des testicules, des cellules épithéliales des canaux testiculaires efférents ou de l'expression de l'aquaporine 1, n'était notée.

Oishi a étudié les effets du butyl parabène chez le rat Wistar (Oishi, 2001) et la souris (Oishi, 2002a). Dans l'étude d'Oishi (2001), le butyl parabène est donné dans le régime alimentaire du jeune rat mâle (3 semaines) pendant 8 semaines (10, 100 et 1 000 mg/j environ). La production spermatique journalière dans les testicules est diminuée de manière dose dépendante et la réserve épididymaire est réduite. Ces paramètres sont affectés dans tous les groupes, même pour ceux ayant reçu des doses les plus faibles. Aux doses de 100 et 1 000 mg/j, des concentrations plus faibles en testostérone sérique ont été également observées ainsi qu'une diminution du poids de l'épididyme et du poids des vésicules séminales à la dose la plus forte. Une toxicité directe sur les spermatozoïdes était suspectée en raison d'effets spermatocides démontrés *in vitro* avec des spermatozoïdes humains (Song et coll., 1989 et 1991). Cependant, l'étude récente sur le butyl parabène chez le rat (Hoberman et coll., 2008), reproduisant l'étude de Oishi, et menée dans des conditions expérimentales satisfaisantes, a montré l'absence d'effet sur les organes reproducteurs mâles. Ces résultats négatifs, en contradiction avec des résultats précédents, ne sont pas liés à un défaut d'exposition des animaux, comme il a été montré récemment (données non publiées d'un consortium industriel fournies à l'Afssaps, 2008).

En ce qui concerne la souris, Oishi (2002b) a examiné les effets du butyl parabène donné dans l'alimentation (environ 14,4, 146 et 1 504 mg/kg/j) à des souris mâles « Crj : CD-1 » de 4 semaines pendant 10 semaines. Aucun effet n'était noté sur le poids de la prostate, des vésicules séminales et des glandes préputiales. Cependant, le poids de l'épididyme était significativement augmenté à la dose la plus forte. Une diminution dose dépendante des spermatides dans les tubes séminifères, sans modification du nombre des spermatogonies et spermatocytes, était observée. La testostérone sérique était significativement diminuée à la plus forte dose. Le tableau 58.I résume les études chez l'animal mâle.

Tableau 58.I : Synthèse des études chez l'animal mâle

Référence	Parabène	Espèce/lignée Âge	Doses (mg/kg poids/j)/ Périodes	Effets significatifs
Administration par voie orale				
Oishi, 2001	Butyl parabène	Rats Wistar (3 semaines)	Environ 10-1 000 Jeune rat mâle 8 semaines	↓ production spermatique journalière dans les testicules ↓ réserve épididymaire ↓ testostérone
Oishi, 2002a	Propyl parabène	Rats Wistar juvénile (21 jours)	Environ 10, 100 ou 1 000 4 semaines	↓ spermatogenèse sans altération de poids des organes reproducteurs ↓ dose dépendante testostérone sérique
Oishi, 2002b	Butyl parabène	Souris Crj :CD-1 (27-29 jours)	Environ 14,4, 146 et 1 504 10 semaines	↑ poids de l'épididyme à la dose la plus forte ↓ dose dépendante des spermatides dans les tubes séminifères, sans modification du nombre des spermatogonies et spermatocytes ↓ testostérone sérique à la plus forte dose
Oishi, 2004	Méthyl éthyl parabène	Rats Wistar (25-27 jours)	Environ 100 et 1 000 8 semaines	Aucun effet : poids des organes reproducteurs, nombre des spermatozoïdes, concentrations sériques en LH, FSH et testostérone
Daston, 2004	Butyl parabène	Rate Sprague-Dawley gestante	10-1 000 Gestation 6-19 j	Pas d'effet développement fœtal
Hoberman et coll., 2008	Méthyl butyl parabène	Rats Wistar juvénile (22 jours)	Environ 10-1 000) 8 semaines	Pas d'effet : poids des organes reproducteurs, nombre des spermatozoïdes, concentrations sériques en LH, FSH et testostérone
Administration par voie sous-cutanée				
Fisher et coll., 1999	Butyl parabène	Rats Wistar	2 Postnatal 2-18 j	Pas d'effet poids et histologie testicules
Kang et coll., 2002	Butyl parabène	Rate Sprague-Dawley gestante	100-200 Gestation (6 j)/ Postnatal (20 j)	↓ poids testicules, vésicules séminales, prostate ↓ nombre, mobilité spermatozoïdes épididymaires
Taxvig et coll., 2008	Éthyl- butyl-parabènes	Rats Wistar	100, 200 ou 400 Gestation 7-21 j	Pas de modification : distance anogénitale, taux plasmatiques de T4, progestérone et testostérone, taux testiculaires de progestérone et testostérone, poids des organes reproducteurs (fœtus)

Études chez la femelle

Peu d'études ont analysé l'effet des parabènes sur les paramètres reproducteurs de la femelle à l'exception des effets utérotrophiques.

Kang et coll. (2002) ont testé l'effet de l'exposition chez les nouveau-nés femelles (rat Sprague-Dawley) après administration de 100 et 200 mg/kg pc/j de butyl parabène par voie sous-cutanée à la rate gestante du 6e jour de gestation au 20e jour après la naissance. Le seul paramètre modifié est le jour de l'ouverture vaginale (précocité). Le poids des organes femelles n'était pas affecté.

Afin de tester la capacité des parabènes à induire une réponse de type œstrogénique sur un organe sensible à cette stimulation hormonale, on utilise des rates immatures ou ovariectomisées, et donc dépourvues d'exposition endogène aux œstrogènes. Les parabènes ont été testés dans plusieurs études utilisant ces tests, mais ont montré des résultats variables : des effets utérotrophiques ont été démontrés pour chacun des parabènes, et pour le PABA (acide para-hydroxy-benzoïque), dans au moins une étude, mais l'absence d'effet a également été démontré au moins une fois. Boberg et coll. dans une revue de 2010, rapportent les résultats de l'ensemble de ces études et considèrent que globalement, les parabènes ont un effet œstrogénique dans ce test.

Routledge et coll. (1998) ont testé les méthyl et butyl parabènes dans un test utérotrophique chez les rates immatures ou ovariectomisées après administration orale et sous-cutanée (les rates ovariectomisées recevaient uniquement l'administration par voie sous-cutanée). Le méthyl jusqu'à 800 mg/kg/j (3 jours) ne modifiait pas le poids de l'utérus dans les deux modèles. Le butyl parabène n'avait aucun effet chez les rates immatures jusqu'à 1 200 mg/kg/j (3 jours) par voie orale. Cependant, l'administration sous-cutanée à des doses comprises entre 400 et 800 mg/kg/j augmentait significativement le poids de l'utérus des rates immatures. Pour les rates ovariectomisées, les doses sous-cutanées de 1 000-1 200 mg/kg/j étaient nécessaires pour produire un effet utérotrophique significatif.

L'administration sous-cutanée de 1,2 ou 12 mg d'isobutyl parabène chez la souris (3 jours) (Darbre et coll., 2002) et l'administration topique de trois doses journalières de 33 mg de benzyl parabène/souris (approximativement 2 000 mg/kg/j) (Darbre et coll., 2003) augmentaient le poids utérin significativement chez les souris CD1 immatures. Trois doses de 10 mg (approximativement 750 mg/kg/j) n'avaient aucun effet.

Lemini et coll. (1997) ont analysé les effets du principal métabolite (PABA) chez les souris CD1 et ont observé une réponse dose dépendante pour les effets utérotrophiques, chez les souris immatures et ovariectomisées à la dose journalière de 5 mg, pendant 3 jours, soit un effet 100 fois moins important que celui du 17β-œstradiol. Mais cet effet n'a pas été confirmé par Hossaini et coll.

(2000) chez la souris immature. Le méthyl, l'éthyl, le propyl et le butyl parabènes n'avaient pas d'effet utérotrophique non plus (administration orale ou sous-cutanée durant 3 jours, jusqu'aux doses de 100 mg/kg/j). Chez les rates immatures Wistar, l'administration sous-cutanée de 5 mg PABA/kg/j était sans effet mais le butyl parabène entraînait une réponse œstrogénique faible à 600 mg/kg/j (Hossaini et coll., 2000).

Dans l'étude de Vo et coll. 2010, les effets des parabènes (méthyl, éthyl, propyl, isopropyl, butyl, et isobutyl parabènes) ont été étudiés sur des femelles rat Sprague-Dawley suite à une exposition pendant la période péripubertaire. Les femelles étaient traitées oralement avec ces parabènes (62,5, 250 et 1 000 mg/kg/j), des jours 21 à 40 après la naissance. Une forte dose de méthyl- et d'isopropyl parabène (1 000 mg/kg/j) entraîne un retard significatif dans la survenue de l'ouverture vaginale (signe de la puberté chez les rongeurs femelles) ainsi qu'une diminution de la longueur de l'œstrus. Cette forte dose des deux composés est responsable d'une diminution du poids des ovaires, d'un manque de corps jaune, et d'une augmentation du nombre de follicules kystiques. L'analyse histologique révèle des anomalies au niveau de l'utérus, à savoir une hypertrophie du myomètre, pour la dose la plus élevée de propyl et isopropyl parabènes (1 000 mg/kg/j) et toutes les doses de butyl et isobutyl parabènes. Les niveaux hormonaux d'œstradiol sont significativement réduits chez les animaux traités par méthyl, éthyl, propyl, isopropyl, et isobutyl parabènes. Une analyse de liaison aux récepteurs des œstrogènes indique que l'affinité de liaison s'effectue de la façon suivante : isobutyl parabène>butyl parabène>isopropyl parabène=propyl parabène>éthyl parabène. Le tableau 58.II résume les études chez l'animal femelle.

Tableau 58.II : Synthèse des études chez l'animal femelle

Référence	Parabène	Espèce/lignée Âge	Doses (mg/kg poids/j)/ Périodes	Effets significatifs
Administration par voie orale				
Routledge et coll., 1998	Méthyl et butyl parabènes	Rates Alpk:AP immatures (21-22 j) ovariectomisées 6-8 semaines	4-1 200 3 j	Pas d'effet utérotrophique
Hossaini et coll., 2000	Méthyl, éthyl, propyl, butyl parabènes PABA	Souris B6D2 F1 (C57B6XDBA2J) immatures	1-1 000 3 j	Pas d'effet utérotrophique
Administration par voie sous-cutanée				
Kang et coll., 2002	Butyl parabène	Rate Sprague-Dawley gestante	100 et 200 Gestion (6 j) Postnatal (20 j)	Précocité de l'ouverture vaginale

Référence	Parabène	Espèce/lignée Âge	Doses (mg/kg poids/j)/ Périodes	Effets significatifs
Routledge et coll., 1998	Méthyl et butyl parabènes	Rates Alpk:AP immatures (21-22 j) ovariectomisées 6-8 semaines	40-1 200 3 j	Butyl 400-800 mg/kg/j Augmentation du poids de l'utérus des rates immatures Rates ovariectomisées, doses 1 000-1 200 nécessaires pour produire un effet utérotrophique significatif
Darbre et coll., 2002	Isobutyl parabène	Souris CD1 immatures	1,2-12 mg/souris 3 j	↑ poids utérin
Darbre et coll., 2003	Benzyl parabène	Souris CD1 immatures	3,3-100 mg (=0,2-7,5 g/kg) topique 3 j	↑ poids utérin (33 mg)
Lemini et coll., 1997	PABA	Souris CD1 immatures (21 j) ovariectomiées	0,005-5 3 j	Effets utérotrophiques à 5
Hossaini et coll., 2000	Méthyl, éthyl, propyl, butyl parabènes PABA	Souris B6D2 F1 (C57B6XDBA2J) immatures Rate Wistar immatures	5-600 3 j	Pas d'effet sauf butyl à 600 (rate uniquement)
Vo et coll., 2010	Méthyl, éthyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl parabènes	Rat Sprague–Dawley Période péripubertaire	62,5, 250 et 1 000 J 21 à 40 postnatal	Retard ouverture vaginale ; ↓ longueur de l'œstrus : méthyl et isopropyl (1 000) ↓ poids des ovaires, manque de corps jaune, augmentation du nombre de follicules kystiques : méthyl et isopropyl (1 000) Hypertrophie du myomètre (propyl, isopropyl parabène : 1 000 ; butyl, isobutyl parabène toutes doses) ↓ œstradiol : méthyl, éthyl, propyl, isopropyl, isobutyl parabènes

Études chez le poisson

Les études des effets des parabènes en dehors des mammifères ont essentiellement utilisé les poissons téléostéens et notamment le zebrafish, le medaka et la truite arc-en-ciel. Des données de toxicité aiguë sont disponibles chez le

vairon (*Pimephales promelos*) et montrent une concentration minimale d'effet (LOEC) des parabènes de 1 à 25 mg/l avec une efficacité inversement proportionnelle à la lipophilicité de la molécule testée (Dobbins et coll., 2009). Aucune donnée n'est disponible à ce jour chez les modèles amphibiens notamment le xénope. Chez les oiseaux, quelques mesures de la présence de parabènes chez le poulet sont disponibles mais aucune étude des effets de ces molécules chez les oiseaux n'a été publiée à ce jour.

L'ensemble des données disponibles chez les poissons suggère que les parabènes présentent une action œstrogénique *in vivo*. La totalité des études menées chez la truite, le medaka et le vairon démontre une induction de la vitellogénine et/ou des choriogénines par les parabènes. Ainsi Pedersen et coll. (2000), en mesurant la vitellogénine chez la truite immature, montrent que l'injection intra péritonéale de 100 à 300 mg/kg d'éthyl parabène, propyl parabène ou butyl parabène provoque une induction. Avec le même test mais des voies d'exposition différentes (ajout dans l'eau pendant 12 jours ou dans la nourriture pendant 10 jours), la même équipe a démontré un effet œstrogénique du propyl parabène et du butyl parabène (Bjerregard et coll., 2003 ; Alslev et coll., 2005). Chez le medaka mâle, Inui et coll. (2003) montrent un effet inducteur du propyl parabène sur la vitellogénine et les choriogénines après ajout dans l'eau à une dose de 55 µM. Une induction de l'expression de ERα à une dose dix fois plus forte est observée dans cette étude. Chez la même espèce, Yamamoto et coll. (2007) montrent une induction de la vitellogénine par le butyl parabène et le benzyl parabène à des doses de 100 à 200 µg/l dans l'eau d'élevage des poissons. L'ensemble des études indique que les parabènes de hauts poids moléculaires (benzyl parabène et butyl parabène) sont plus efficaces que ceux de faibles poids moléculaires (éthyl parabène, propyl parabène). Ces données ont reçu une confirmation *in vitro* récente grâce aux travaux de Terasaki et coll. (2009) qui montrent dans un test double hybride que 6 sur 21 des parabènes testés peuvent activer le récepteur ERα de medaka, le benzyl parabène étant la molécule la plus active. Les parabènes sont cependant 1 000 à 100 000 fois moins actifs que le ligand naturel 17β-œstradiol.

D'une façon curieuse et encore inexpliquée, ces données ne sont pas confirmées chez le zebrafish en ce qui concerne le propyl parabène (les autres parabènes n'ont pas été testés). En effet, chez cette espèce dans deux dispositifs expérimentaux différents, l'équipe de Kamila Kruzikova observe soit une activité anti-œstrogénique avec un effet inhibiteur sur l'expression de la vitellogénine (Mikula et coll., 2006 ; molécule ajoutée dans l'eau pendant 20 jours à 0,1, 0,4 ou 0,9 mg/l), soit pas d'effet sur la vitellogénine (Mikula et coll., 2009). L'une des publications met en évidence un changement de sex-ratio (augmentation du nombre de femelles) induit par le propyl parabène à 500 mg/kg dans la nourriture (Mikula et coll., 2009). La raison de cette différence n'est pas connue et peut être liée soit à une spécificité d'espèce qui serait étonnante, soit au fait que le dispositif expérimental (voie d'exposition, durée) est différent de celui utilisé dans les autres études.

En conclusion, la majorité des études retrouvent un effet utérotrophique chez la rate ou la souris du méthyl, butyl, benzyl et isobutyl parabène et du principal métabolite, le PABA. Des résultats contradictoires sont rapportés en ce qui concerne l'âge de la puberté. Chez l'animal mâle, une seule équipe a retrouvé des effets délétères du propyl et butyl parabène. Enfin, l'ensemble des données disponibles chez les poissons suggèrent que les parabènes présentent une action œstrogénique *in vivo*.

Bibliographie

ALSLEV B, KORSGAARD B, BJERREGAARD P. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout Oncorhynchus mykiss exposed via food and water. *Aquat Toxicol* 2005, **72** : 295-304

BJERREGAARD P, ANDERSEN DN, PEDERSEN KL, PEDERSEN SN, KORSGAARD B. Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout Oncorhynchus mykiss after exposure via food and water. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003, **136** : 309-317

BOBERG J, TAXVIG C, CHRISTIANSEN S, HASS U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxico* 2010, **30** : 301-312

DARBRE PD, BYFORD JR, SHAW LE, HORTON RA, POPE GS, SAUER MJ. Œstrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *J Appl Toxicol* 2002, **22** : 219-226

DARBRE PD, BYFORD JR, SHAW LE, HALL S, COLDHAM NG, POPE GS, SAUER MJ. Œstrogenic activity of benzylparaben. *J Appl Toxicol* 2003, **23** : 43-51

DASTON GP. Developmental toxicity evaluation of butylparaben in Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2004, **71** : 296-302

DOBBINS LL, USENKO S, BRAIN RA, BROOKS BW. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using Daphnia magna and Pimephales promelas. *Environ Toxicol Chem* 2009, **28** : 2744-2753

FISHER JS, TURNER KJ, BROWN D, SHARPE RM. Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ Health Perspect* 1999, **107** : 397-405

HOBERMAN AM, SCHREUR DK, LEAZER T, DASTON GP, CARTHEW P, et coll. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008, **83** : 123-133

HOSSAINI A, LARSEN JJ, LARSEN JC. Lack of œstrogenic effects of food preservatives (parabens) in uterotrophic assays. *Food Chem Toxicol* 2000, **38** : 319-323

INUI M, ADACHI T, TAKENAKA S, INUI H, NAKAZAWA M, UEDA M, WATANABE H, MORI C, IGUCHI T, MIYATAKE K. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (Oryzias latipes). *Toxicology* 2003, **194** : 43-50

KANG , CHE JH, RYU DY, KIM TW, LI GX, et coll. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *J Vet Med Sci* 2002, **64** : 227-235

LEMINI C, SILVA G, TIMOSSI C, LUQUE D, VALVERDE A, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ M, HERNÁNDEZ A, RUBIO-PÓO C, CHÁVEZ LARA B, VALENZUELA F. Estrogenic effects of p-hydroxybenzoic acid in CD1 mice. *Environ Res* 1997, **75** : 130-134

MIKULA P, DOBSIKOVA R, SVOBODOVA Z, JARKOVSKÝ J. Evaluation of xenœstrogenic potential of propylparaben in zebrafish (Danio rerio). *Neuro Endocrinol Lett* 2006, **27** (Suppl 2) : 104-107

MIKULA P, KRUÍKOVÁ K, DOBŠÍKOVÁ R, HARUŠTIAKOVÁ D, SVOBODOVÁ Z. Influence of Propylparaben on Vitellogenesis and Sex Ratio in Juvenile Zebrafish (Danio rerio) Acta Vet. *BRNO* 2009, **78** : 319-326

OISHI S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* 2001, **17** : 31-33

OISHI S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 2002a, **40** : 1807-1813

OISHI S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol* 2002b, **76** : 423-429

OISHI S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol* 2004, **42** : 1845-1849

PEDERSEN KL, PEDERSEN SN, CHRISTIANSEN LB, KORSGAARD B, BJERREGAARD P. The preservatives ethyl-, propyl- and butylparaben are œstrogenic in an in vivo fish assay. *Pharmacol Toxicol* 2000, **86** : 110-113

ROUTLEDGE EJ, PARKER J, ODUM J, ASHBY J, SUMPTER JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic.*Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **153** : 12-19

SCCP. Opinion on Parabens SCCP/1017/06. 2006

SONG BL, LI HY, PENG DR. In vitro spermicidal activity of parabens against human spermatozoa. *Contraception* 1989, **39** : 331-335

SONG BL, PENG DR, LI HY, ZHANG GH, ZHANG J, LI KL, ZHAO YQ. Evaluation of the effect of butyl p-hydroxybenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991, **91** : 435-440

TAXVIG C, VINGGAARD AM, HASS U, AXELSTAD M, BOBERG J, et coll. Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicol Sci* 2008, **106** : 206-213

TERASAKI M, KAMATA R, SHIRAISHI F, MAKINO M. Evaluation of estrogenic activity of parabens and their chlorinated derivatives by using the yeast two-hybrid assay and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Environ Toxicol Chem* 2009, **28** : 204-208

YAMAMOTO H, WATANABE M, HIRATA Y, NAKAMURA Y, NAKAMURA Y, KITANI C, SEKIZAWA J, UCHIDA M, NAKAMURA H, KAGAMI Y, KOSHIO M, HIRAI N, TATARAZAKO N. Preliminary ecological risk assessment of butylparaben and benzylparaben-1. Removal efficiency in wastewater treatment, acute/chronic toxicity for aquatic organisms, and effects on medaka gene expression. *Environ Sci* 2007, **14** (Suppl) : 73-87

VO TTB, YOO YM, CHOI KC, JEUNG EB. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reprod Toxicol* 2010, **29** : 306-316. Epub 2010 Feb 2.

59
Mécanismes d'action

Plusieurs études *in vivo* ont mis en évidence des effets œstrogéniques des parabènes (Darbre et coll., 2002 et 2003 ; Vo et Jeung, 2009). L'étude des mécanismes d'action a été centrée sur la liaison aux récepteurs aux hormones stéroïdes (ER et AR).

Récepteurs nucléaires : activité œstrogénique

Dès 1998, des études ont mis en évidence la capacité des parabènes à se lier au récepteur œstrogénique. Les parabènes ont cependant une capacité de liaison au récepteur des œstrogènes de 10 000, 30 000, 150 000 et 2 500 000 fois plus faible (respectivement pour le butyl, le propyl, l'éthyl et le méthyl parabène) que le ligand naturel, le 17β-œstradiol (Routledge et coll., 1998).

Dans un test d'inhibition compétitive, Blair et coll. (2000) ont testé sept parabènes pour leur capacité à déplacer l'œstradiol tritié du récepteur aux œstrogènes isolé de l'utérus de rate ovariectomisée : l'éthyl hexyl parabène était le plus puissant (RBA – *relative binding affinity* – 0,018 %) suivi par l'heptyl (0,008 %), le benzyl (0,003 %), le butyl (0,0009 %), le propyl (0,0006 %), l'éthyl (0,0006 %), et le méthyl parabène (0,0004 %). Pour comparaison dans cet essai, le bisphénol A avait un RBA de 0,008 %. Des résultats similaires ont été rapportés par Nishihara et coll. (2000), dans un test de levure recombinante transfectée avec le gène *ERa* et utilisant la β-galactosidase comme gène rapporteur. Dans le test de levure recombinante, l'intensité de l'activité œstrogénique mesurée augmente avec la longueur de la chaîne (méthyl<éthyl<propyl<butyl parabène) (Routledge et coll., 1998). Le PABA, métabolite principal, n'a aucune affinité pour ce récepteur.

De nombreuses études ont étudié l'affinité des parabènes pour le récepteur aux œstrogènes dans le test de prolifération des cellules issues de la lignée tumorale mammaire MCF-7 (Darbre et coll., 2002 et 2003 ; Pugazhendhi et coll., 2005 et 2007 ; Van Meeuwen et coll., 2008 ; Sadler et coll., 2009). La capacité de stimulation est 10^5 à 10^7 fois inférieure à celle du 17β-œstradiol (Okubo et coll., 2001 ; Byford et coll., 2002). L'activité œstrogénique augmente dans l'ordre méthyl, éthyl, propyl, butyl, isopropyl et isobutyl parabènes ; les RBA

sont similaires pour les récepteurs alpha et beta (Okubo et coll., 2001). Ces résultats sont confirmés par Byford et coll. (2002) qui rapportent également qu'à 10^{-6} M, les parabènes augmentent l'expression des gènes régulés dans les cellules MCF-7. Darbre et coll. (2002 et 2003) ont confirmé l'activité œstrogénique de l'isobutyl et du benzyl parabène dans les cellules MCF-7. Ces parabènes augmentent l'expression des gènes régulés par les œstrogènes à des concentrations de 10^{-5} M.

Pugazhendhi et coll. (2007) ont analysé l'expression de 19 881 gènes dans les cellules MCF-7 après 7 jours d'exposition à 5×10^{-4} M de méthyl parabène, 10^{-5} M de n-butyl parabène et 10^{-8} M de 17β-œstradiol. L'étude a identifié des gènes sur- ou sous- régulés à la même intensité par les parabènes et le 17β-œstradiol. Cependant, la majorité des gènes était régulée différemment par les trois traitements et des différences existaient entre les parabènes eux-mêmes. De telles différences sont également rapportées par Sadler et coll. (2009). Ainsi, parmi les gènes régulés par les œstrogènes, seuls 39 % le sont par le méthyl parabène et 27 % par le butyl parabène. Certains gènes sont régulés de la même façon par l'œstradiol et les deux parabènes comme le récepteur B de l'IL17. Certains gènes ne sont régulés que par l'œstradiol (*syndecan 2*), le méthyl parabène (*connexine 37*) ou le butyl parabène (*HSPC157*).

Pour Terasaka et coll. (2006), la longueur des chaînes alkyles des parabènes est importante pour l'effet œstrogénique dans les cellules MCF-7. Il existe une corrélation forte entre l'expression des gènes dépendants des œstrogènes et ceux induits par le propyl parabène, comparativement au méthyl parabène ou à l'éthyl parabène. Cet effet a également été rapporté par d'autres groupes (Gomez et coll., 2005).

Le tableau 59.I présente les relations entre un œstrogène et les parabènes par différentes méthodes.

Tableau 59.I : Résumé des corrélations entre le 17β-œstradiol et les parabènes (Terasaka et coll., 2006)

Composé	Corrélation avec Gènes œstrogène dépendant (coefficient R)	Liaison à ER (RBA %)[a]	Test de double hybride en levure (REC10, M)[b]
Œstrogène (17β-œstradiol)	0,91[c]	100	3×10^{-10}
Méthyl parabène	-0,21	0,0004	4×10^{-4}
Éthyl parabène	0,19	0,0006	1×10^{-4}
Propyl parabène	0,74	0,0006	1×10^{-5}
Butyl parabène	0,60	0,0009	3×10^{-6}

[a] Données Blair et coll. (2000). RBA est l'affinité de liaison relative par rapport à celle du 17β-œstradiol de 10 % ;
[b] Données Nishihara et coll. (2000). REC10 indique la concentration (M) des parabènes donnant 10 % de l'activité de 10 nM de 17β-œstradiol, quantifiée par l'activité de la β-galactosidase dans un système de gènes rapporteurs ;
[c] Moyenne de 9 essais pour 120 gènes (S.D. = 0.024)

Rajapakse et coll. (2002) ont observé que les combinaisons de xéno-œstrogènes qui incluent le benzyl parabène, peuvent produire un effet même si les concentrations de chaque composé sont inférieures à celle requise lorsqu'ils sont testés isolément.

Une hypothèse concernant l'activité œstrogénique des parabènes a été proposée par Prusakiewicz et coll. (2007). Les auteurs ont rapporté que les parabènes inhibent les sulfotransférases de la peau et des kératinocytes. Ces enzymes participent au métabolisme des œstrogènes et leur inhibition pourrait conduire à une augmentation du taux des œstrogènes endogènes. Dans cette étude, le butyl parabène possédait la plus forte activité inhibitrice.

Récepteur nucléaires : activité anti-androgénique

Une très faible activité anti-androgénique a également été observée *in vitro* avec le méthyl, propyl et butyl parabène (Chen et coll., 2007 ; Kim et coll., 2010).

En conclusion, un certain nombre d'études ont mis en évidence la capacité des parabènes à se lier au récepteur des œstrogènes avec cependant une affinité 10 000 à 2 500 000 fois plus faible que le ligand naturel. Dans plusieurs tests, l'intensité de l'activité œstrogénique augmente avec la longueur de la chaîne (méthyl<éthyl<propyl<butyl parabène).

Bibliographie

BLAIR RM, FANG H, BRANHAM WS, HASS BS, DIAL SL, MOLAND CL, TONG W, SHI L, PERKINS R, SHEEHAN DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci* 2000, **54** : 138-153

BYFORD JR, SHAW LE, DREW MG, POPE GS, SAUER MJ, et coll. Œstrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002, **80** : 49-60

CHEN J, AHN KC, GEE NA, GEE SJ, HAMMOCK BD, et coll. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, **221** : 278-284

DARBRE PD, BYFORD JR, SHAW LE, HORTON RA, POPE GS, et coll. Œstrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *J Appl Toxicol* 2002, **22** : 219-226

DARBRE PD, BYFORD JR, SHAW LE, HALL S, COLDHAM NG, et coll. Œstrogenic activity of benzylparaben. *J Appl Toxicol* 2003, **23** : 43-51

GOMEZ E, PILLON A, FENET H, ROSAIN D, DUCHESNE MJ, et coll. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *J Toxicol Environ Health A* 2005, **68** : 239-251

KIM TS, YOON CY, JUNG KK, KIM SS, KANG IH, BAEK JH, JO MS, KIM HS, KANG TS. In vitro study of Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) endocrine disruptor screening and testing methods- establishment of a recombinant rat androgen receptor (rrAR) binding assay. *J Toxicol Sci* 2010, **35** : 239-243

NISHIHARA T, NISHIKAWA J, KANAYAMA T, DAKEYAMA F, SAITO K, et coll. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J Health Sci* 2000, **46** : 282-298

OKUBO T, YOKOYAMA Y, KANO K, KANO I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food Chem Toxicol* 2001, **39** : 1225-1232

PRUSAKIEWICZ JJ, HARVILLE HM, ZHANG Y, ACKERMANN C, VOORMAN RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology* 2007, **232** : 248-256

PUGAZHENDHI D, POPE GS, DARBRE PD. Œstrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *J Appl Toxicol* 2005, **25** : 301-309

PUGAZHENDHI D, SADLER AJ, DARBRE PD. Comparison of the global gene expression profiles produced by methylparaben, n-butylparaben and 17beta-œstradiol in MCF7 human breast cancer cells. *J Appl Toxicol* 2007, **27** : 67-77

RAJAPAKSE N, SILVA E, KORTENKAMP A. Combining xenœstrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 2002, **110** : 917-921

ROUTLEDGE EJ, PARKER J, ODUM J, ASHBY J, SUMPTER JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **153** : 12-19

SADLER AJ, PUGAZHENDHI D, DARBRE PD. Use of global gene expression patterns in mechanistic studies of œstrogen action in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2009, **114** : 21-32

TERASAKA S, INOUE A, TANJI M, KIYAMA R. Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicol Lett* 2006, **163** : 130-141

VAN MEEUWEN JA, VAN SO, PIERSMA AH, DE JONG PC, VAN DEN BERG M. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **230** : 372-382

VO TTB, JEUNG EB. An Evaluation of Estrogenic Activity of Parabens Using Uterine Calbindin-D9k Gene in an Immature Rat Model. *Toxicological Sciences* 2009, **112** : 68-77

60
Études structure-fonction, études *in silico*

Les parabènes sont des esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, présentant un cycle benzénique substitué en para par un groupement ester avec des chaînes alkyles de taille variable. Ils ont une structure similaire à d'autres produits connus pour être « *œstrogen like* » : les alkylphénols.

Relation structure-fonction

Les quatre premiers parabènes de la série (méthyl, éthyl, n-propyl et n-butyl parabènes) ont des effets œstrogéniques sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7 (Routledge et coll., 1998 ; Byford, et coll., 2002). En particulier, Byford et ses collaborateurs (2002) ont détecté des effets d'inhibition compétitive vis-à-vis du 17β-œstradiol (E2) pour des concentrations élevées en parabène (jusqu'à un million de fois en excès molaire). Si l'E2 a son pic d'activité (dans les cellules MCF-7) pour des concentrations comprises entre 10^{-10} et 10^{-8} M, les parabènes présentent un maximum dans l'intervalle 10^{-5} à 10^{-4} M. Ces quatre molécules présentent une affinité de liaison (*relative binding affinity*, RBA) faible pour le récepteur du ligand naturel, E2, autour de 0,001 % (Byford, et coll., 2002). Cette affinité augmente avec la longueur de la chaîne alkyle, comme observé pour le récepteur de l'utérus du rat (Blair et coll., 2000).

L'affinité de liaison est également linéairement corrélée avec l'hydrophobicité, ce qui démontre l'importance de l'interaction faible impliquant le cycle benzénique (Darbre et coll., 2003).

Des conclusions similaires ont été obtenues dans l'étude fournie par Morohoshi et ses collaborateurs (2005). Dans cette étude *in vitro* sur 37 produits chimiques (dont 11 parabènes) présents dans les lotions solaires, 11 composés (principalement 7 parabènes avec des chaînes alkyles linéaires et ramifiées, et des benzophénones) présentaient une RBA entre 0,001 et 0,077 % pour le récepteur alpha aux œstrogènes. Les auteurs suggèrent que l'affinité augmente avec la longueur et la ramification de la chaîne, ce propos étant en accord avec des études précédentes (Okubo et coll., 2001).

La littérature ne semble pas présenter d'études dédiées spécifiquement aux relations QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) entre la structure des parabènes et leurs interactions avec les récepteurs endocriniens. En

revanche, ces molécules font partie des ensembles de *training* et de test de plusieurs modèles QSAR pour la RBA des perturbateurs endocriniens (Dodge, 1998 ; Shi et coll., 2001 ; Lill et coll., 2005 ; Roncaglioni et coll., 2008). Ces modèles sont caractérisés par un bon accord entre les valeurs expérimentales et calculées, mais le nombre de parabènes considérés (en moyenne moins de dix) ne permet pas d'évaluer la fiabilité des modèles pour cette classe de molécules. À noter qu'il est proposé que l'interaction entre le substrat et le récepteur est à 50 % stérique et à 50 % électrostatique, suggérant, donc, un rôle équivalent entre la liaison hydrogène et les interactions de Van Der Waals du cycle.

Modèles *in silico*

Comme pour les autres ligands du récepteur ER, le groupe hydroxyle des parabènes peut former une liaison H à l'intérieur de la poche de l'E2 avec le Glu353 et l'Arg394 (et une molécule d'eau). Cette interaction a été mise en évidence par des simulations atomistiques (mécanique moléculaire) qui suggèrent des agrégats substrat/récepteur stables (Byford et coll., 2002). La faible activité *in vitro* des parabènes a été attribuée à la taille de la molécule petite par rapport à la poche du récepteur. En effet, les simulations atomistiques montrent que, à cause de leurs dimensions réduites, deux parabènes (du méthyl parabène au n-butyl parabène) peuvent entrer à l'intérieur de la poche du récepteur. Dans ce cas, la deuxième molécule formera une liaison hydrogène avec l'His524, située à l'autre extrémité de la poche. À noter que l'énergie d'interaction de deux parabènes est environ deux fois celle d'un seul, cela montre la faible répulsion entre les deux ligands. Deux parabènes à l'intérieur du récepteur peuvent donner lieu à des effets de synergie (Byford et coll., 2002).

Une étude théorique utilisant des modèles structuraux pour le récepteur et des méthodes de calculs plus performants (issues de la chimique quantique) donnent des relations qualitatives entre l'activité et l'énergie d'interaction de quatre parabènes (méthyl, n-butyl, benzyl et isobutyl parabènes) (Guadarrama et coll., 2008), même si les résultats pour le méthyl parabène sont en contradiction avec l'expérience (Godfrey 2008).

En conclusion, les parabènes présentent une affinité de liaison faible pour le récepteur des œstrogènes. Cette affinité augmente avec la longueur de la chaîne alkyle et elle est également linéairement corrélée avec l'hydrophobicité. La faible activité *in vitro* des parabènes a été attribuée à la petite taille de la molécule, par rapport à la poche du récepteur, mais deux parabènes (du méthyl parabène au n-butyl parabène) peuvent entrer à l'intérieur de cette poche pouvant donner lieu à des effets de synergie.

Bibliographie

BLAIR RM, FANG H, BRANHAM WS, HASS BS, DIAL SL, et coll. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci* 2000, **54** : 138-153

BYFORD JR, SHAW LE, DREW MGB, POPE GS, SAUER MJ, DARBRE PD. Œstrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002, **80** : 49-60

DARBRE PD, BYFORD JR, SHAW LE, HALL S, COLDHAM NG, et coll. Œstrogenic activity of benzylparaben. *J Appl Toxicol* 2003, **23** : 43-51

DODGE A. Natural and anthropogenic environmental œstrogens: the scientific basis for risk assessment. Structure/activity relationships. *Pure Appl Chem* 1998, **70** : 1725-1733

GODFREY D. Comment on: Construction of simplified models to simulate estrogenic disruptions by esters of 4-hydroxybenzoic acid (parabens). P Guadarrama, S Fomine, R Salcedo, A Martínez. Biophys. Chem. 137 (2008) 1-6. doi:10.1016/j.bpc2008.06.001. *Biophysical Chemistry* 2008, **138** : 63-64

GUADARRAMA P, FOMINE S, SALCEDO R, MARTINEZ A. Construction of simplified models to simulate estrogenic disruptions by esters of 4-hydroxy benzoic acid (parabens). *Biophys Chem* 2008, **13** : 1-6

LILL MA, WINIGER F, VEDANI A, ERNST B. Impact of induced fit on ligand binding to the androgen receptor: a multidimensional QSAR study to predict endocrine-disrupting effects of environmental chemicals. *J Med Chem* 2005, **8** : 5666-5674

MOROHOSHI K, YAMAMOTO H, KAMATA R, SHIRAISHI F, KODA T, MORITA M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in Vitro* 2005, **19** : 457-469

OKUBO T, YOKOYAMA Y, KANO K, KANO I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food and Chemical Toxicology* 2001, **39** : 1225-1232

RONCAGLIONI A, PICLIN N, PINTORE M, BENFENATI E. Binary classification models for endocrine disrupter effects mediated through the estrogen receptor. *SAR and QSAR in Environmental Research* 2008, **19** : 697-733

ROUTLEDGE EJ, PARKER J, ODUM J, ASHBY J, SUMPTER JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **153** : 12-19

SHI LM, FANG H, TONG W, WU J, PERKIN SR, et coll. QSAR models using a large diverse set of estrogens. *J Chem Inf Comput Sci* 2001, **41** : 186-195

61
Conclusions et perspectives de recherche

En raison de leurs propriétés antibactérienne et antifongique, les parabènes sont employés comme conservateurs, en particulier dans les produits cosmétiques et certaines spécialités pharmaceutiques. Pour la première fois en 2004, ces composés ont été retrouvés intacts dans des tissus adipeux de carcinomes mammaires. Bien que leur présence dans ces tissus n'implique pas un rôle fonctionnel dans le développement de la maladie, ces premiers résultats ont suscité un intérêt important pour ces composés. Depuis, la quantification des parabènes (libres ou conjugués) dans les urines a été proposée comme biomarqueur spécifique de leur exposition. Ils ont été retrouvés dans la majorité des échantillons urinaires de populations nord-américaine et européenne (n'ayant pas *a priori* d'exposition atypique connue à ces composés).

L'absorption dermique des parabènes chez l'Homme a été mise en évidence par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Les études animales de l'absorption des parabènes par voie cutanée chez le rat sont à interpréter avec prudence, compte tenu des différences de capacité métabolique des peaux. Par voie orale ou assimilée, les études animales (rat, chien, chat et lapin) ont montré que l'absorption des parabènes est rapide (en heures) et importante. Quelle que soit l'espèce étudiée, la métabolisation des parabènes aboutit à l'hydrolyse de ces derniers en acide para-hydroxybenzoïque (PABA) qui est le métabolite principal. Les parabènes (composés parents) ont également été retrouvés dans le cerveau, la rate et le pancréas tandis que les métabolites ont été détectés dans le foie et les reins. Chez la femelle gestante, l'éthyl et le butyl parabènes peuvent se concentrer (jusqu'à 10 fois) dans le liquide amniotique. Les quelques études réalisées chez l'homme par voie orale montrent des résultats similaires : absorption rapide, métabolisation importante et rapide et forte excrétion. Finalement, les voies d'exposition à ces composés par absorption dermique et par ingestion sont à considérer pour expliquer l'imprégnation de la population générale.

Dès 1998, des études *in vitro* s'intéressant aux mécanismes d'action de ces composés ont mis en évidence la capacité des parabènes à se lier au récepteur œstrogénique, et cette activité œstrogénique serait fonction de la longueur des chaînes alkyles de différents parabènes (méthyl, éthyl, propyl, butyl). Une activité anti-androgénique a également été observée plus récemment *in vitro*

avec les méthyl, propyl et butyl parabènes. Enfin, les parabènes pourraient exercer une activité « indirecte » de perturbation endocrine par l'inhibition des sulfotransférases, enzymes nécessaires à la régulation de l'action des œstrogènes *in vivo*.

Les études *in vivo* chez les mammifères ont été réalisées principalement chez le rat et la souris, par administration par voie orale ou sous-cutanée, sur des animaux jeunes. Chez le mâle, aucun effet sur les fonctions reproductives n'a été observé pour les méthyl et éthyl parabènes. Pour les propyl et butyl parabènes, les résultats apparaissent controversés et contradictoires en particulier pour le butyl parabène. La plupart des études chez la femelle s'appuient sur des animaux immatures ou ovariectomisés et ont montré des résultats variables : des effets utérotrophiques pour chacun des parabènes et pour le PABA ainsi qu'une absence d'effet ont pu être observés. Trop peu d'études animales se sont intéressées à ce jour aux expositions *in utero* à ces composés. Chez les poissons, l'ensemble des données disponibles suggère que les parabènes présentent une action œstrogénique *in vivo* (induction de la vitellogénine et/ou des choriogénines par les parabènes chez la truite, le medaka et le vairon).

Peu d'études épidémiologiques existent à ce jour, en particulier en raison du développement récent des méthodes de dosages chimiques des parabènes dans les matrices biologiques permettant de mesurer l'exposition humaine à ces composés. Ces données épidémiologiques se sont intéressées à la qualité spermatique et au risque de cancer du sein (exposition mesurée par l'usage de déodorants ou d'anti-transpirants). Elles sont à ce jour insuffisantes et ne permettent ni d'écarter clairement un impact de l'exposition humaine aux parabènes, ni d'apporter de la plausibilité à cet impact possible sur la santé reproductive humaine.

Aujourd'hui, d'autres études épidémiologiques, en particulier longitudinales caractérisant les expositions dès la vie intra-utérine, doivent être encouragées, ainsi que des études chez l'animal prenant en compte la réalité des expositions humaines à des mélanges de parabènes (ceux observés majoritairement dans les produits cosmétiques et les médicaments). Bien que certains résultats chez l'animal puissent paraître rassurants en particulier pour l'éthyl et le méthyl parabènes quant à la santé reproductive humaine, de nombreuses questions restent encore inabordées. L'impact d'une exposition *in utero* aux parabènes est mal déterminé malgré la présence de ces composés démontrée dans le liquide amniotique (rat). Il concerne aussi bien le développement des organes reproducteurs, que la croissance intra-utérine et le développement neuropsychologique et comportemental des enfants, qui sont hors du champ de l'expertise actuelle mais pour lesquels des études existent. L'exposition régulière à faible dose et à long terme à ces composés est encore trop peu étudiée ; elle correspond pourtant à une réalité d'exposition (par l'usage quotidien de crèmes par exemple). Le potentiel de bioaccumulation de ces composés et l'impact possible sur la reproduction et les organes reproducteurs

doivent être évalués. Enfin, l'évaluation de la reprotoxicité des parabènes doit pouvoir prendre en compte le cumul possible d'autres composés ayant une activité de perturbation endocrinienne et qui sont associés aux parabènes dans les produits cosmétiques (comme certains phtalates par exemple) ou médicamenteux.

Synthèse

Selon un certain nombre d'études, une augmentation de la prévalence des troubles du versant masculin de la fonction de reproduction a été observée dans plusieurs pays occidentaux au cours des dernières décennies. Les données les mieux documentées concernent le cancer du testicule.

Il a été montré de manière non ambiguë que l'incidence du cancer du testicule, le cancer le plus fréquent chez l'homme jeune, a augmenté depuis plus de 50 ans dans de nombreux pays d'Europe. Cet accroissement est de 0,1 à 0,2 cas pour 100 000 personne-année, conduisant à un doublement de l'incidence dans les pays européens depuis 1970. En France, on observe une élévation moyenne de 2,5 % par an sur la période 1980-2005. En 2010, le taux d'incidence en France est estimé à 7 cas pour 100 000 personne-année. Cette élévation ne peut être expliquée ni par un vieillissement de la population ni par une évolution des pratiques de dépistage.

Deux types de malformations relativement fréquentes, l'hypospadias (anomalies des voies génitales externes mâles) et la cryptorchidie (anomalie de la descente testiculaire constatée à la naissance) semblent également en augmentation ; les données issues des registres sont cependant moins fiables que pour le cancer du testicule et les études ponctuelles sont en nombre limité. D'importantes variations géographiques sont constatées. Les données disponibles en France montrent une nette augmentation de l'incidence de l'hypospadias depuis la fin des années 1970 jusqu'au début des années 2000. Pour la cryptorchidie, il n'y a pas de données suffisantes en France permettant d'estimer son évolution.

Parallèlement, une baisse de la concentration spermatique a été rapportée en Amérique du Nord et en Europe. En France, les études menées à partir des données des Centres d'études et de conservation des œufs et du sperme (Cecos) indiquent également dans certaines régions, une baisse significative de la concentration spermatique et une baisse de la mobilité des spermatozoïdes morphologiquement normaux. Globalement, la détérioration temporelle de plusieurs caractéristiques spermatiques peut être considérée comme plausible dans certains pays industrialisés.

Les connaissances sur les évolutions temporelles de la fertilité des couples sont beaucoup plus limitées. Les quelques études fondées sur des indicateurs tels que la fécondabilité (estimée à partir du délai nécessaire pour concevoir), et qui avaient souvent des limitations méthodologiques, ne montrent pas de modification dans le temps de la fertilité des couples dans certaines zones de la Suède, du Danemark ou du Royaume-Uni. Des travaux indirects indiquent

qu'une détérioration des caractéristiques spermatiques aurait pu avoir un impact sur la proportion de couples souffrant d'infécondité involontaire ou éligibles pour une assistance médicale à la procréation. Dans l'ensemble, ces travaux ne permettent pas d'apporter de conclusion forte concernant l'évolution temporelle de la fertilité des couples au cours des dernières décennies dans les pays industrialisés. En l'absence de système de surveillance de la fertilité dans la plupart de ces pays, une réponse à cette question est peu susceptible d'être apportée prochainement.

Au début des années 2000, l'équipe du professeur Skakkebaek à Copenhague a formulé l'hypothèse que la survenue d'un cancer du testicule, une altération de la production et de la qualité spermatique, la cryptorchidie et l'hypospadias pouvaient avoir une origine et des causes communes résultant d'une perturbation du développement du testicule pendant la vie fœtale. Le concept de « syndrome de dysgénésie testiculaire » qui a été proposé, reste cependant controversé.

Chez les filles, dans les pays occidentaux, l'observation la plus marquante concerne la tendance séculaire à une puberté plus précoce. La courbe de cette évolution varie d'un pays à l'autre. D'après les données norvégiennes, finlandaises et américaines, une diminution est estimée à 0,3 an par décennie ; en France, une diminution de 0,18 an par décennie est observée.

En l'absence de données historiques sur les expositions environnementales à l'échelle des populations, les études descriptives sur les évolutions temporelles de la fonction de reproduction ne permettent pas d'explorer les causes de ces évolutions. De nombreuses études étiologiques ont été réalisées pour tenter d'expliquer les différences observées entre individus ; ces études ne peuvent qu'indirectement renseigner les variations. À l'heure actuelle, c'est pour les facteurs tels que le tabagisme (à l'âge adulte ou subi durant la vie intra-utérine), pour certaines expositions professionnelles et pour les polluants les plus persistants dans l'organisme que les données suggérant un impact éventuel sur la fonction de reproduction sont les plus complètes. Pour analyser l'impact d'une exposition à des composés chimiques sur la santé reproductive, de nombreux travaux en toxicologie animale et en épidémiologie ont été conduits dans différents contextes de recherche ou d'évaluation de risque. La transposition des résultats des travaux d'une espèce à une autre implique une connaissance des similitudes et des différences dans les différentes étapes du développement de la fonction de reproduction.

Fonction de reproduction et différences entre les espèces

Chez tous les vertébrés, le testicule et l'ovaire se développent à partir d'une ébauche embryonnaire initialement bipotentielle mâle et femelle. À différents moments de son développement, variables en fonction des espèces, cette

ébauche évolue vers une différenciation mâle ou femelle selon son patrimoine génétique (mammifères, oiseaux) ou des facteurs environnementaux comme la température ou le comportement (certains reptiles et poissons). On distingue donc une détermination génétique du sexe et une détermination environnementale. Il est important de prendre en considération ces différents modes de différenciation sexuelle pour évaluer les effets de facteurs environnementaux comme les perturbateurs endocriniens. Une modification du milieu aura plus de conséquences chez les poissons et les reptiles que dans d'autres espèces de vertébrés.

Chez les mammifères, le sexe est déterminé génétiquement à la fécondation selon que le spermatozoïde est porteur ou non du chromosome Y. Le gène *SRY* sur le chromosome Y induit la différenciation mâle des cellules somatiques de la gonade en cellules de Sertoli. Chez la femelle, en l'absence de Y, la différenciation de l'ovaire s'effectue à partir de la gonade bipotentielle. Le développement fœtal et néonatal des gonades est une phase particulièrement sensible, et toute substance chimique capable de perturber ces étapes précoces aura des répercussions sur la fonction de reproduction.

En fonction du sexe, les gonades se différencient pour produire des gamètes (gamétogenèse des cellules germinales) et synthétiser des hormones (stéroïdogenèse) sous l'effet desquelles le tractus génital interne et externe va évoluer pour permettre la reproduction : mise en place d'un appareil reproducteur accordé au sexe de la gonade qui assurera les fonctions de maturation des gamètes, insémination, fécondation, gestation ou parturition.

Chez les mâles, la stéroïdogenèse débute pendant la vie fœtale dans toutes les espèces, alors que chez les femelles, sa mise en route varie selon les espèces. Ainsi, les espèces avec un système hormonal actif pendant la vie fœtale (ruminants, espèce humaine) pourraient être plus sensibles aux effets par exemple des perturbateurs endocriniens. Très précocement, le testicule fœtal sécrète deux types d'hormones : l'hormone anti-mullérienne sécrétée par les cellules de Sertoli et la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig. La testostérone est responsable de la différenciation des voies génitales mâles. La protéine *Insulin-like* 3 (INSL3), produite par les cellules de Leydig fœtales et adultes, est responsable du développement du gubernaculum impliqué dans la descente des testicules.

Chez les mammifères, les gonades se forment pendant la vie intra-utérine au cours du premier tiers de la gestation. Il existe un décalage dans le temps entre la différenciation mâle et femelle. La différenciation testiculaire est plus précoce que la différenciation ovarienne. Cela implique qu'une exposition à un perturbateur endocrinien à un moment donné du développement *in utero* n'aura pas les mêmes effets chez un fœtus mâle ou femelle.

La différenciation du tractus génital mâle est beaucoup plus dépendante de la production d'hormones que ne l'est celui de la femelle. En effet, les ovaires du fœtus ne sont pas indispensables à la féminisation de l'organisme alors que les

testicules le sont pour la masculinisation. Cela est à prendre en considération pour comprendre pourquoi certaines substances induisent des effets plus marqués chez le mâle que chez la femelle. Tout dérèglement de la fonction hormonale précoce aura certainement des conséquences plus marquées chez le mâle que chez la femelle.

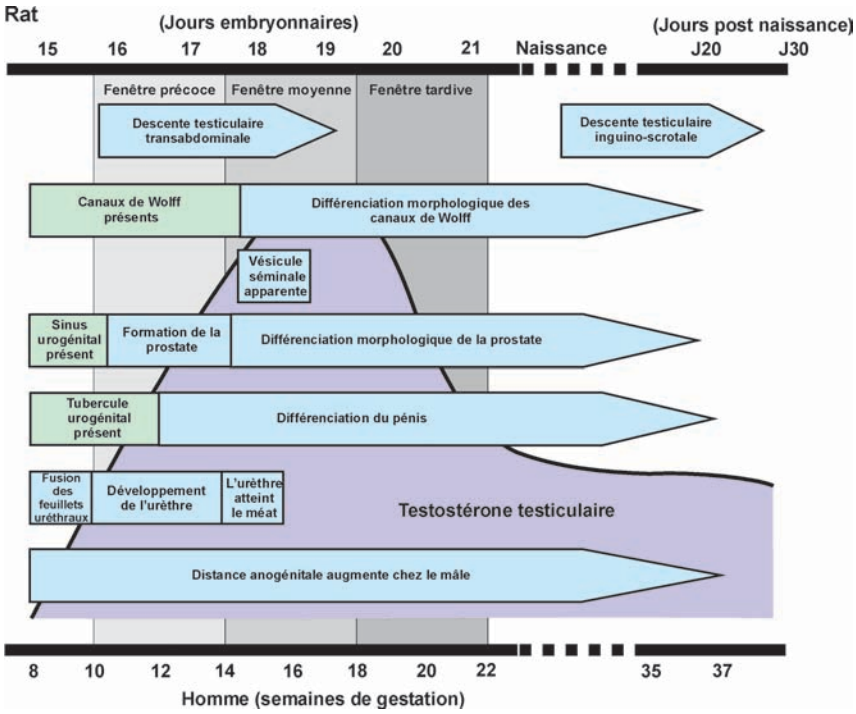


Diagramme représentant les principales périodes du development du tractus génital mâle chez l'homme et le rat, en relation avec le niveau de production de testostérone (d'après Welsh et coll., 2008)

En revanche, la disparition ou la diminution brutale d'un grand nombre de cellules germinales aura des répercussions sur la différenciation de l'ovaire alors que l'absence de spermatogonies n'influence pas la différenciation du testicule.

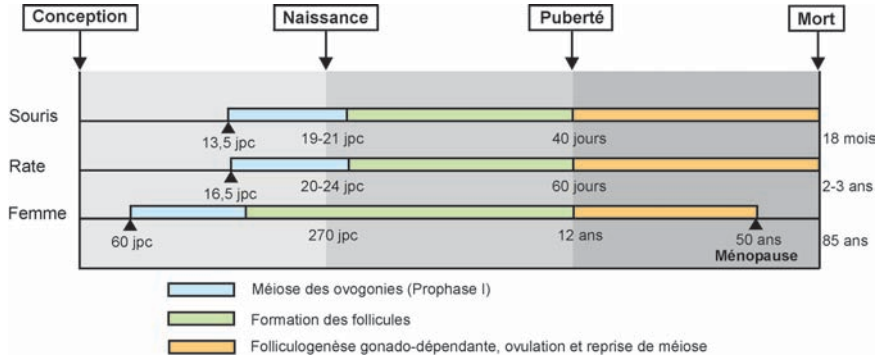
Le stock de follicules primordiaux formé dans l'ovaire fœtal, est fixe et déterminé pour toute la vie reproductive de la femelle tandis que la spermatogenèse produit des gamètes de façon continue, de la puberté à la sénescence, chez le mâle. Toute altération quantitative des cellules germinales survenue très tôt chez la femelle sera donc irréversible et peut avoir des effets à très long terme (20 à 30 ans) sur la fertilité. Chez le mâle, ce sont les altérations qualitatives qui risquent d'avoir des effets à long terme.

Les différentes étapes du développement ovarien et testiculaire, bien que globalement similaires chez tous les mammifères, présentent des variations importantes entre espèces et ne se déroulent pas pendant des périodes similaires. Ainsi par exemple, la formation des follicules débute dans l'ovaire pendant la vie fœtale chez l'être humain et pendant la vie postnatale chez les rongeurs. Cependant, les rongeurs sont le plus souvent utilisés comme modèles en toxicologie de la reproduction.

Il existe également des différences physiologiques (et pathologiques) au niveau du développement et de la fonction reproductive entre mammifères qui rendent l'extrapolation entre rongeurs et espèce humaine parfois difficile. Ainsi, l'ouverture vaginale qui signe le début de la puberté chez la souris n'existe pas chez les primates. À l'inverse, l'endométriose est une pathologie spécifique des primates.

Par ailleurs, les rongeurs sont des animaux polyovulants : à chaque cycle une dizaine, voire plus, de follicules vont arriver à l'ovulation et une dizaine d'ovocytes seront produits. Les mécanismes qui régulent la folliculogenèse et l'ovulation sont donc différents chez le rat ou la souris et dans les espèces monoovulantes comme l'homme ou les ruminants.

Les rongeurs naissent beaucoup plus immatures que la plupart des autres mammifères, ce qui limite l'extrapolation des expositions reçues après la naissance. La période néonatale des rongeurs correspond du point de vue du développement à la fin de la grossesse chez l'homme. En conséquence, la période où ont lieu, par exemple, la folliculogenèse ovarienne, ou le développement du système nerveux central diffère entre l'homme et le rat, de sorte que des perturbations durant la gestation auront plus d'impact sur ces deux mécanismes chez l'homme que chez les rongeurs.



Comparaison des périodes de différenciation ovarienne chez différents mammifères (d'après Monniaux et coll., 2009)

Chez l'homme, le testicule, comme toutes les glandes endocrines, est sous le contrôle du complexe hypothalamo-hypophysaire. La gonadotrophine (GnRH) libérée par l'hypothalamus stimule la sécrétion de deux hormones hypophysaires : la folliculostimuline (FSH) et l'hormone luthéinisante (LH). La FSH agissant sur les cellules de Sertoli, participe à l'initiation de la spermatogenèse. À la puberté, la LH augmente la production de testostérone qui agit directement sur les cellules de Sertoli pour assurer le bon déroulement de la spermatogenèse.

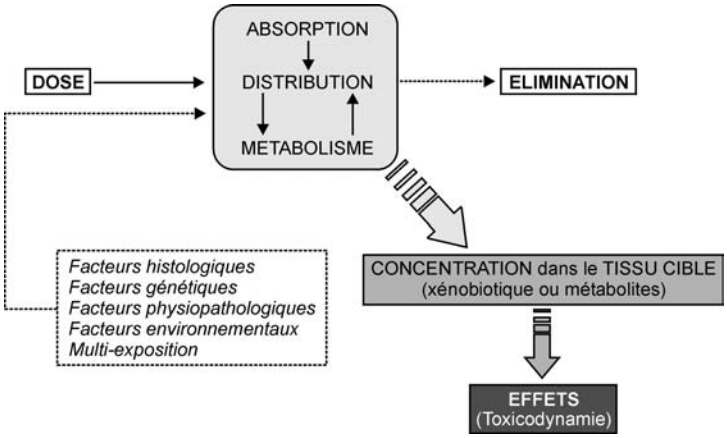
Chez la femme, les ovaires sécrètent deux hormones, l'œstradiol et la progestérone. Au cours de la folliculogenèse, les cellules de la granulosa (qui ont la même origine que les cellules de Sertoli) deviennent sensibles à la FSH et vont continuer à se multiplier et à se différencier (comme les cellules de Leydig chez le mâle). Les androgènes sécrétés diffusent dans les cellules de la granulosa et, sous l'influence de la FSH, sont transformés en œstradiol. La différenciation des cellules de la granulosa produit également le liquide folliculaire et le follicule devient le follicule à antrum. La sécrétion brutale de LH déclenche la maturation finale de l'ovocyte et l'ovulation.

L'extrapolation des résultats obtenus chez les rongeurs (souris, rat) à l'homme exige de la prudence et doit prendre en compte les différences chronologiques et physiologiques qui existent entre les deux espèces. D'autres animaux apparaissent plus pertinents que les rongeurs, notamment ceux, comme par exemple les ruminants qui présentent de longues durées de gestation et de vie, qui sont mono-ovulants et ne portent qu'un seul petit par portée.

Les effets d'exposition *in utero* à des substances chimiques peuvent se révéler à très long terme ou parfois s'atténuer avec le temps. Il est donc indispensable de réaliser des études longitudinales avec plusieurs moments d'investigation (à la naissance, au sevrage, à la puberté, à l'âge adulte). L'intervalle de temps entre l'arrêt de l'exposition et le moment de l'étude doit être pris en compte car il peut expliquer une partie des résultats contradictoires de la littérature scientifique.

Devenir d'un xénobiotique dans l'organisme

Le devenir d'un xénobiotique dans l'organisme peut se schématiser selon quatre étapes majeures : absorption ; distribution (avec stockage éventuel dans des organes ou des tissus cibles) ; biotransformation de la substance absorbée ; élimination.



Principales étapes pharmacocinétiques

L'absorption dépend en premier lieu des propriétés physico-chimiques de la substance elle-même, à savoir sa masse moléculaire, son degré d'ionisation, sa réactivité, sa solubilité. Les agents chimiques lipophiles sont mieux à même de traverser une membrane dont les constituants sont pour l'essentiel des lipides. Toutefois, en particulier au niveau de l'intestin, les substances très lipophiles sont moins bien absorbées en raison de la difficulté à former une solution ou une émulsion dans la lumière intestinale. La relation entre la dose externe et interne dépend donc en grande partie du niveau d'absorption, qui peut être lui-même affecté par le caractère lipophile de la substance ou encore, pour certains composés, de l'efficacité des systèmes de pompe à efflux tels que les P-glycoprotéines.

La différence entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme dans la paroi intestinale, de l'efflux vers la lumière intestinale ou encore du métabolisme présystémique dans le foie.

Bien que certaines barrières membranaires soient moins perméables que d'autres, les mécanismes de diffusion obéissent, de façon générale aux mêmes règles que celles qui régissent l'absorption et dépendent en premier lieu des caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique. Le franchissement de la barrière placentaire est à examiner avec attention car la vie fœtale constitue une période particulièrement sensible du développement. Si l'exposition du fœtus aux œstrogènes maternels est limitée en raison de leur liaison à l'α-fœtoprotéine (protéine qui n'est normalement produite que par le fœtus au cours de son développement), nombre de substances chimiques (étiquetées

comme perturbateurs endocriniens) sont beaucoup moins affines à cette protéine et se retrouvent de ce fait facilement dans la circulation fœtale. C'est ce qui semble se passer pour le bisphénol A.

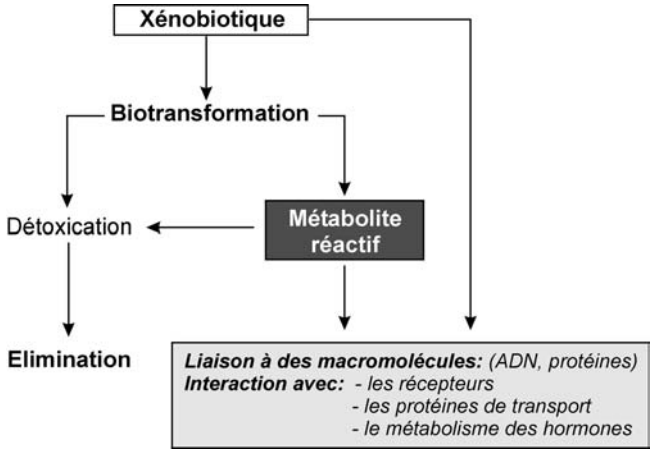
Afin de pouvoir être excrétées dans l'urine ou dans la bile, les molécules doivent être hydrosolubles. La transformation chimique du xénobiotique est essentiellement catalysée par des enzymes qui fonctionnent avec des co-facteurs endogènes. Conceptuellement, ce processus a été séparé en deux phases au cours desquelles le xénobiotique est oxydé, réduit ou hydrolysé (phase I) et/ou conjugué à l'acide glucuronique, à un groupement sulfate ou acétate, au glutathion ou encore à un acide aminé (phase II). Ces réactions prennent en charge non seulement les xénobiotiques, mais également les composés endogènes comme les stéroïdes, les prostaglandines ou encore certaines vitamines.

Les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP), enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique, jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques. On dénombre une soixantaine de CYP différents chez l'homme et une douzaine d'entre eux sont utilisés dans le métabolisme des xénobiotiques, parmi lesquels les formes 1A1/2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4 sont les plus fréquemment impliquées. Une induction du ~~CYP2C19~~ (aromatase) peut favoriser une surproduction d'œstrogènes et des effets féminisants. Un polymorphisme génétique, fréquent pour les formes 2C9, 2C19 et 2D6, se traduit par des différences interindividuelles de susceptibilité à l'action des toxiques.

Erratum : CYP2C19 → CYP19A1

Les réactions de phase II les plus fréquemment utilisées par l'organisme sont la glucuronidation et la conjugaison au glutathion et au groupement sulfate. Même si un grand nombre de tissus peuvent exprimer des enzymes de biotransformation, c'est le foie qui est l'organe principal du métabolisme. Il est toutefois possible que certaines isoformes particulières soient spécifiquement exprimées dans un tissu extra-hépatique. C'est par exemple le cas de l'aromatase qui chez l'adulte est exprimée dans les ovaires, le placenta, le tissu adipeux, l'os ou dans une moindre mesure, le testicule, mais non dans le foie, alors que les niveaux d'expression sont très élevés dans le foie fœtal.

Les voies de bioactivation passent le plus souvent par la production d'un métabolite ayant une affinité ou une activité bien plus forte que la substance initiale vis-à-vis d'une protéine de transport ou d'un récepteur nucléaire. Ainsi, des substances, inactives dans leur état initial, peuvent devenir œstrogéniques après l'intervention d'une enzyme, généralement un cytochrome P450, (il en est ainsi pour les phtalates, les composés polybromés...).

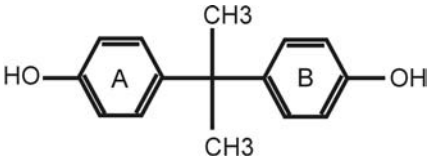


Voies de bioactivation/détoxication des xénobiotiques

Une fois formés, les métabolites sont excrétés dans l'urine par le rein ou éliminés dans les fèces via la bile. L'excrétion dans le lait maternel peut également intervenir de façon substantielle, comme cela a été montré pour les composés polybromés (PBDE), les phtalates ou le bisphénol A. Généralement, les rongeurs excrètent davantage de métabolites par voie biliaire que le chien, le singe ou l'homme. Cela est dû à des différences entre espèces dans le seuil d'excrétion biliaire des métabolites. Après avoir été éliminés dans la bile, les conjugués glucuronides et sulfates peuvent facilement être hydrolysés dans le tube digestif. Les produits de biotransformation ainsi libérés sont ensuite réabsorbés par l'intestin et de nouveau métabolisés au niveau du foie. On parle alors de cycle entéro-hépatique, dont la conséquence première est une augmentation du temps de séjour du xénobiotique dans l'organisme.

Bisphénol A

Le 4,4-isopropylidènediphénol, plus couramment appelé bisphénol A (ou BPA), est un composé chimique de synthèse utilisé notamment dans la fabrication industrielle des plastiques de type polycarbonates et de celle des résines époxy.



Structure chimique du bisphénol A

Les polycarbonates sont présents dans un grand nombre d'objets courants (CD, lunettes, certaines bouteilles plastiques, biberons) ; on retrouve les résines époxy dans les revêtements intérieurs des boîtes de conserve ou les amalgames dentaires. Le bisphénol A entre également dans la composition du PVC et de certains plastifiants ainsi que dans les papiers thermosensibles (délivrés par exemple par les caisses enregistreuses).

Le bisphénol A est actuellement classé en tant que substance reprotoxique de catégorie 3[29]. Les évaluations de risque réalisées à la demande des agences sanitaires internationales (EFSA en Europe) ont conduit à définir une dose journalière tolérable de 50 µg de bisphénol A par kg de poids corporel et par jour, soit 2,5 mg par jour pour un individu de 50 kg. Depuis juillet 2010, la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de bisphénol A sont suspendues en France jusqu'à l'adoption par l'Agence française (Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) d'un avis motivé autorisant éventuellement à nouveau ces opérations[30].

Au cours des dernières années, un nombre croissant de travaux menés dans des laboratoires de recherche académiques ont documenté des effets divers du bisphénol A sur la reproduction.

Exposition

Selon les agences sanitaires internationales, la principale source d'exposition de la population générale est alimentaire. Elle résulte du passage du bisphénol A dans l'aliment ou la boisson à partir des polymères plastiques et résines époxy utilisés pour les emballer ou les contenir.

Chez l'adulte, certains auteurs estiment que la consommation de boissons contenues dans des bouteilles en polycarbonates, d'aliments en conserve ou de denrées chauffées au four à micro-ondes dans leur emballage, entraîne une ingestion moyenne de 0,1 µg de bisphénol A par kg de poids corporel et par jour.

Dans son avis de janvier 2010, l'Afssa estime, d'après les données de la littérature, que l'exposition des nourrissons résultant à la fois du biberon et de l'emballage du lait maternisé se situerait entre 0,2 et 2 µg de bisphénol A par kg de poids corporel et par jour. Des données similaires sont présentées dans un récent rapport (Joint FAO/WHO *Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Summary Report* 1-5 novembre 2010)[31].

29. Reprotoxique de catégorie 3 : substance jugée « préoccupante pour la fertilité de l'espèce humaine » en raison « d'effets toxiques possibles » mais non démontrés sur la reproduction
30. LOI n° 2010-729 du 30 juin 2010
31. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/agns/BPA_Summary_Report.pdf

La manipulation de papiers thermosensibles (délivrés par les caisses enregistreuses) ou l'inhalation de poussières contaminées par le bisphénol A, pourraient constituer d'autres sources de contamination en particulier pour certaines populations. Par ailleurs, des dérivés du bisphénol A utilisés en tant que composites dentaires induisent des taux salivaires élevés en bisphénol A chez les patients. Ceci suggère que plusieurs voies d'exposition ou encore l'exposition à certains dérivés du bisphénol A doivent être envisagées.

Les mesures de bisphénol A effectuées dans le sang, l'urine, le lait maternel et d'autres tissus indiquent que plus de 90 % des personnes vivant dans les pays occidentaux sont exposées à des niveaux détectables de bisphénol A. Des taux supérieurs à la limite de détection de 0,5 µg/l ont été retrouvés dans le placenta, le liquide amniotique et le fœtus chez les rongeurs et dans l'espèce humaine. Le bisphénol A est donc capable de passer la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus.

D'après une étude allemande, les enfants (3-5 ans) constituent le sous-groupe présentant la plus forte imprégnation, avec un taux urinaire moyen de 3,5 µg/l. En France, les taux urinaires dans un échantillon de femmes le jour de l'accouchement en bisphénol A total et libre sont en valeur médiane égales à 2,9 et 0,5 µg/g de créatinine respectivement et le ratio bisphénol A libre/bisphénol A total est de 0,17.

Les niveaux d'exposition chez l'adulte comme chez l'enfant estimés à partir des taux urinaires correspondent à une exposition inférieure à la dose journalière tolérable de 50 µg/kg/j.

Chez l'homme adulte, le bisphénol A absorbé par voie digestive est éliminé rapidement dans l'urine sous forme de BPA-glucuronide. La demi-vie plasmatique est de l'ordre de 4-6 h. Dans le contexte d'une expostion ponctuelle, une grande partie du BPA est éliminée en 24 h. Des valeurs semblables ont été récemment rapportées chez les rongeurs et le singe.

Les extrapolations des données de pharmacocinétique de l'animal à l'homme sont délicates en raison d'importantes différences interespèces dans les processus d'élimination. Des polymorphismes des enzymes de conjugaison chez l'homme pourraient entraîner d'importantes variations individuelles dans la capacité de détoxication. Enfin, des processus de déconjugaison des métabolites (libérant du bisphénol A) pourraient intervenir dans certains organes cibles.

Études épidémiologiques

Peu d'études épidémiologiques ont évalué, à court et à long terme, les effets d'une exposition au bisphénol A sur la fonction de reproduction.

Une étude menée en Chine entre 2004 et 2008 a montré, chez des travailleurs fabriquant des produits à base de bisphénol A, que cette exposition au BPA

(environ 50 fois plus élevée qu'en population générale) était associée à une augmentation des troubles déclarés de leur fonction sexuelle (trouble de l'érection, insatisfaction sexuelle). Une seconde publication des mêmes auteurs suggère qu'une association pourrait exister chez des travailleurs non exposés à leur poste de travail entre des niveaux de BPA comparables à ceux de la population générale et l'expression d'une « insatisfaction sexuelle ».

En 2010, deux études ont rapporté chez des hommes consultant pour infertilité ou partenaires de femmes enceintes, des modifications du taux des hormones impliquées dans la reproduction en association avec des niveaux urinaires plus élevés de bisphénol A.

Deux études ont montré une diminution de la concentration spermatique en association avec les taux urinaires de bisphénol A, taux correspondant à ceux rencontrés en population générale. Une autre étude réalisée chez des hommes féconds n'a pas trouvé d'association. Aucune étude longitudinale n'a encore été conduite sur la question, et il n'y a pas non plus de donnée humaine concernant l'impact de l'exposition au bisphénol A durant la vie intra-utérine sur la fonction de reproduction à l'âge adulte. Au total, très peu d'études ont été réalisées et on ne peut pas considérer que le bisphénol A, aux doses auxquelles la population générale est exposée, soit sans danger pour le versant masculin de la fonction de reproduction.

À l'heure actuelle, les études réalisées chez la femme sur le risque de cancer du sein ou d'endométriose reposent toutes sur une approche rétrospective (particulièrement limitée pour un composé non persistant comme le bisphénol A) et des populations cliniques de convenance, sans plan d'échantillonnage précis et ne sont donc pas informatives.

Études chez l'animal

Les deux principales études de toxicité menées chez le rat et la souris selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) n'ont pas mis en évidence d'effets significatifs sur la reproduction chez les mâles, les femelles et leur descendance, après une exposition au bisphénol A dès la gestation et sur plusieurs générations, à des doses comparables à une exposition environnementale chez l'homme (entre 3 µg/kg/j et 300 mg/kg/j).

Cependant, au cours des dernières années, plusieurs travaux réalisés dans des laboratoires de recherche académiques sur différentes souches de rats et de souris, et à partir de protocoles expérimentaux diversifiés, ont attiré l'attention sur des effets peu étudiés jusqu'alors et surtout sur des périodes d'exposition particulières. Ces études mettent l'accent sur les conséquences d'une exposition au bisphénol A *in utero* et pendant la lactation, susceptible d'interférer directement avec le développement de l'embryon, puis du nouveau-né et d'engendrer des effets à long terme sur la reproduction du jeune et de l'adulte (mâle ou femelle).

Chez le rat et la souris mâle, après exposition pendant la gestation et la période postnatale, plusieurs études révèlent des effets du bisphénol A sur l'appareil génital (hypotrophie testiculaire, hypertrophie prostatique, distance anogénitale plus courte, retard à la séparation du prépuce...), sur la production de spermatozoïdes, sur le taux des hormones mâles et sur la fertilité (diminution de la taille des portées...) avec des doses de l'ordre de quelques µg/kg/j. Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans toutes les études.

Chez le rat et la souris femelle après exposition pendant la gestation et la période postnatale, le bisphénol A peut induire une puberté précoce, des altérations de l'utérus, du vagin, de l'ovaire, de l'endomètre (effets apparaissant pour des doses variant de 0,2 à 500 µg/kg/j selon les espèces et lignées utilisées).

Par ailleurs, après une exposition *in utero*, des anomalies du comportement maternel et du comportement sexuel sont observées dans les deux sexes.

La transmission à la descendance de certains de ces effets chez les rongeurs exposés suggère que le bisphénol A peut induire des altérations de l'information épigénétique et perturber l'expression de gènes. Ces études posent le problème de la transmission des effets délétères aux générations suivantes. Ceci justifie que les études longitudinales soient poursuivies sur plusieurs générations.

Enfin, les études réalisées dans plusieurs lignées d'une même espèce de rongeurs, montrent des variabilités intra espèce (et inter individu) de réponse au bisphénol A. Ces variabilités sont le reflet du polymorphisme génétique et pourraient également être attribuées à des expositions antérieures subies au cours des différentes phases de la vie. Le fait que les altérations ne soient pas retrouvées dans toutes les études et la mise en évidence de sensibilité variable de certaines lignées ne peut pas constituer des arguments en faveur de l'absence d'effets ; ceci doit inciter à comprendre comment des facteurs génétiques et environnementaux peuvent moduler la réponse au bisphénol A.

Chez les vertébrés aquatiques, le BPA peut modifier l'action des hormones sexuelles et provoquer des inversions partielles du sexe ainsi que des anomalies du développement embryonnaire, à des doses compatibles avec les quantités retrouvées dans certaines rivières.

Organes et tissus cibles

L'exposition au bisphénol A pendant la phase de constitution des organes au cours de la gestation semble particulièrement critique.

Pour l'appareil reproducteur femelle, l'exposition au BPA pendant la phase de constitution du tissu mammaire *in utero* peut modifier le développement de cet organe (à des doses de 0,25 µg/kg/j), augmenter sa sensibilité aux œstrogènes durant la puberté et conduire à l'apparition de lésions précancéreuses (à des doses de 25 ou 250 µg/kg/j).

De même, la période fœtale ou néonatale semble constituer une période critique au cours de laquelle une exposition au bisphénol A pourrait altérer le développement de la prostate et favoriser l'apparition de lésions précancéreuses (avec des doses de 10 à 20 µg/kg/j).

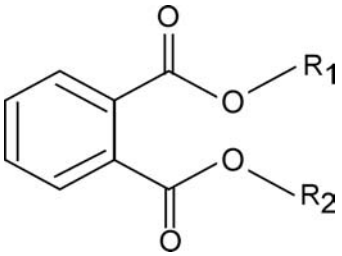
La survenue de cancers hormonodépendants (sein ou prostate), de type carcinome semble être favorisée par une altération, due au BPA, dans le développement de l'organe.

Le risque tumoral serait ensuite accru par une exposition à l'âge adulte aux hormones ou à des cancérogènes environnementaux.

Un lien entre une exposition au bisphénol A *in utero* et des lésions de l'endomètre (de type endométriose) est suspecté.

Phtalates

Les phtalates sont le produit d'estérification d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools. On distingue des esters phtaliques dont les deux fonctions acides sont estérifiées par le même alcool (DEHP, DBP), ou par des alcools différents (BBP) ou encore par des alcools de type oxo (DINP, DIDP).



Structure chimique de base des phtalates

R_1, R_2 = C2H5 : DEP Diéthyl-phtalate ;
R_1, R_2 = C8H17 : DEHP Di(2-éthyl-hexyl)-phtalate
R_1, R_2 = C4H9 : DBP Dibutyl-phtalate
R_1, R_2 = C9H20 : DINP Diisononyl-phtalate
R_1, R_2 = C4H9, C7H7 : BBP Butylbenzyl-phtalate

Parmi les phtalates les plus fréquemment utilisés, outre le DEHP, mentionnons le BBP, le DBP, le DEP et le DINP.

Les phtalates sont retrouvés dans plusieurs produits utilisés couramment tels les adhésifs, les revêtements de sol en vinyle, les huiles lubrifiantes, les condensateurs électriques, les détergents, les solvants, les produits pharmaceutiques, les fils et les câbles électriques et les produits cosmétiques (parfums, déodorants, lotions après rasage, shampooings, aérosols pour cheveux, vernis

à ongles...). La particularité des phtalates utilisés en plasturgie tient au fait qu'ils ne sont pas liés de manière covalente aux polymères auxquels ils confèrent leur souplesse. Ils peuvent donc facilement migrer dans les matériaux d'emballages et être relargués dans le milieu environnant, en particulier lorsque les plastiques qui en contiennent sont soumis à des températures élevées.

Des interdictions et restriction d'usage ont été promulguées par la Commission européenne : dans les préparations à destination du grand public (peintures et colles...), tous les phtalates classés CMR1 et 2 sont interdits ; concernant les articles, interdiction du DEHP, DBP et BBP dans la production des jouets et les articles pour enfants ; interdiction du DINP, DIDP et DNOP (di-n-octyl phtalate) pour les jouets des enfants de moins de trois ans. Les phtalates tels que le DBP, DEHP, BBP ne sont pas autorisés dans les produits cosmétiques ; le DEHP est également interdit dans les matériaux de contact alimentaire. L'usage du DEHP dans les dispositifs médicaux est restreint si les nouveau-nés, les femmes enceintes et allaitant, doivent y être exposés.

Les évaluations de risque effectuées par les autorités sanitaires, l'EFSA en Europe, sur le DEHP, le DBP, le DIDP, le BBP et le DINP ont abouti à des doses journalières tolérables (DJT) de respectivement 50, 10, 150, 500 et 150 µg par kg de poids corporel et par jour.

Exposition

L'exposition humaine à certains phtalates est importante et croît régulièrement en raison de la très large utilisation de cette famille de composés et de l'augmentation des niveaux de production au cours des trente dernières années.

Cette exposition peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou encore la nourriture et résulte à la fois de l'inhalation, de l'ingestion ou encore de l'absorption percutanée de ces produits. L'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des emballages contenant des phtalates demeure la principale source d'exposition pour la population générale adulte. L'alimentation est en particulier la principale source d'exposition pour le DEHP, DBP et DIBP (diisobutyl-phtalate). Chez les enfants, l'ingestion via les contacts mains-bouche pourrait être également importante.

L'exposition chez l'adulte au DEHP est estimée en moyenne à environ 2 µg/kg de poids corporel par jour d'après les données de concentrations urinaires en DEHP ou de ses métabolites dans les populations occidentales. Elle est légèrement plus faible pour les autres phtalates. On observe peu de différences entre les hommes et les femmes.

Comparés (dans le même temps et dans les mêmes études) aux adultes, tous les enfants (0-3 ans) présentent des concentrations urinaires 3 à 5 fois plus élevées. D'après des données allemandes, 1,5 % des enfants en Allemagne

présentent une exposition au DEHP supérieure au niveau d'exposition pour lequel l'absence d'effet adverse n'est pas certaine. En France, dans un échantillon de femmes le jour de l'accouchement, les taux urinaires en métabolites sont en valeur médiane égales à 42 µg/l et 28 µg/l respectivement pour le 5OH-MEHP et le 5oxo-MEHP.

Sur la base des teneurs en DEHP dans les aliments pour bébés, des auteurs ont estimé que l'exposition par la voie alimentaire des nourrissons de moins de 6 mois était de près de 10 µg/kg pc/j et de près de 20 µg/kg pc/j chez les enfants de plus de 6 mois. Depuis les interdictions et restriction d'usage, d'autres phtalates (DINP) sont plus souvent retrouvés en particulier chez les enfants.

Les dispositifs médicaux (poches de sang, tubulures...) représentent pour certains sous-groupes de la population une source non négligeable d'exposition aux phtalates, en particulier au DEHP. L'exposition via les dispositifs médicaux touche principalement les hémodialysés, les donneurs et receveurs de plaquettes et les enfants prématurés. *L'European Chemicals Bureau* (ECB) estimait en 2008 que l'exposition pouvait atteindre 3 000 µg/kg pc/j, chez les hémodialysés adultes et 1 700 µg/kg pc/j chez les nouveau-nés transfusés.

Selon les composés, la demi-vie plasmatique chez l'Homme est de 8 à 48 heures. Elle est de 18 heures pour le DEHP. Si on n'observe pas de bioaccumulation, il est important de signaler que comme pour le BPA, l'exposition est continue du fait de la diversité des sources de contamination (alimentaire, environnement, cosmétiques...). Les études réalisées chez l'homme ou la femme montrent que certains phtalates ou leurs métabolites sont retrouvés dans les urines, le plasma sanguin, le plasma séminal, le lait maternel, le liquide amniotique et le sang du cordon.

Le métabolisme des phtalates conduit à la production de métabolites non oxydés et oxydés. Des études récentes semblent indiquer que chez l'homme, les principaux métabolites dans les urines sont les métabolites oxydés. La mesure des métabolites oxydés dans les liquides biologiques permet d'exclure les contaminations liées au matériel utilisé lors du dosage.

La concentration maximum sanguine en MEHP (métabolite du DEHP) est 7,5 fois plus faible chez le primate non humain (singe) que chez le rat. Chez l'homme et le singe, le MEHP est présent dans le sang et l'urine essentiellement comme glucuro-conjugué. Cependant, des métabolites de DEHP, avec des chaînes ester carboxylées, sont retrouvés sous formes conjuguées et libres dans les échantillons urinaires humains. Différents tissus peuvent être la cible de ces métabolites (testicule, ovaire...). Les différences dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion entre différentes espèces (rongeurs, singes et humains) peuvent expliquer des différences de sensibilité aux effets des phtalates.

Études épidémiologiques

Quatre études se sont intéressées aux anomalies du nouveau-né et de l'enfant en recherchant une exposition pendant la gestation et au cours des premiers mois de vie.

Pour la première fois en 2008, une étude a montré une relation entre les taux les plus élevés de métabolites (MEP, MBP, MEHP) ainsi que des métabolites oxydés (MEHHP, MEOHP) chez les mères à 29 semaines de gestation (en moyenne) et une « distance anogénitale » (mesurée entre le centre de l'anus et la base du pénis) plus courte chez les nourrissons mâles. Concernant les anomalies de l'appareil génital du petit garçon (hypospadias, cryptorchidie), très peu d'etudes avec un nombre suffisant de cas ont été réalisées et ne permettent pas de conclure à l'existence d'un rôle des phtalates sur la survenue de ces troubles.

Chez les fillettes, un effet sur la puberté précoce a été analysé et les résultats des études ne sont pas concluants.

Chez l'homme adulte, plusieurs études transversales retrouvent un lien entre les concentrations de métabolites urinaires des phtalates et une altération des paramètres du sperme parmi lesquels la concentration et la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Deux études ne mettent pas en évidence de relation entre les concentrations urinaires en phtalates et les paramètres du sperme. Par ailleurs, une étude de type exposé/non exposé met en évidence une relation entre les concentrations plus élevées de métabolites urinaires en phtalates et les concentrations basses de testostérone.

Chez les femmes, peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates sur la santé reproductive. Seul le risque d'endométriose a été spécifiquement évalué et les preuves apportées par ces quelques études de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose sont insuffisantes. Les effets de l'exposition aux phtalates sur la fonction ovulatoire et certains niveaux hormonaux (œstradiol, progestérone, LH, FSH) suggérés dans les études animales ne sont pas relatés chez la femme.

L'évaluation des effets des phtalates est rendue complexe du fait de la diversité au niveau des études, des populations étudiées, de la méthodologie des dosages et des limites de détection ainsi que des paramètres phénotypiques pris en compte.

Études chez l'animal mâle

Les études de références ayant servi à la détermination de la DJT pour le DEHP et le DBP ont été conduites dans trois lignées de rat (Sprague-Dawley, Wistar, Fisher). Les expositions ont été effectuées pendant la gestation et/ou la période néonatale ou encore sur plusieurs générations. Une atteinte testiculaire et des pathologies des organes sexuels mâles accessoires tels que

vésicules séminales, prostate, épididyme ont été rapportées à différents stades du développement. De nombreuses études rapportent une baisse du poids de la prostate, une diminution de la distance anogénitale, une augmentation des hypospadias ou cryptorchidies, une rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons, une diminution de la longueur du pénis... Les effets sont signalés aux doses de DEHP et de DBP de 150 et 500 mg/kg/j. Les mêmes effets peuvent être obtenus à des doses plus faibles (100 mg) en présence des deux phtalates. Par ailleurs, il semble que certaines lignées de rat puissent être sensibles à des doses de 10 à 100 mg/kg/j.

Des modifications des caractéristiques spermatiques (taux de spermatozoïdes, morphologie) et des altérations des taux d'hormones (testostérone, LH...) sont observées après exposition au DEHP et au DPB (doses supérieures à 100 mg/kg/j) chez le rat ou le lapin. Le DBP réduit la production de testostérone fœtale, mais cet effet disparaît rapidement après l'arrêt du gavage. La plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale montre qu'à l'âge adulte les taux plasmatiques de testostérone des mâles traités *in utero* sont comparables à ceux d'animaux non exposés. Une baisse de la fertilité n'est rapportée que pour des doses élevées (doses supérieures à 500mg/kg/j).

Chez le singe mâle (marmouset, cynomolgus), ces effets sont retrouvés après exposition à ces deux phtalates (aux mêmes doses) mais de manière moins évidente que chez le rat.

Organes et tissus cibles chez le mâle

La très grande majorité des études chez le rat, réalisées par gavage durant la gestation, rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule fœtal : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales. Les travaux signalent de manière cohérente une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'INSL3 de ces cellules pendant la vie fœtale ce qui conduit à inhiber la masculinisation ou le développement des organes reproducteurs androgéno-dépendants. Cet effet n'est pas observé chez la souris. Concernant les cellules de Sertoli, leur nombre et leur prolifération peuvent être inhibés transitoirement lors d'une exposition *in utero* chez le rat sans que l'on sache s'il s'agit d'un effet direct ou indirect via l'inhibition de la synthèse d'androgène.

Concernant les cellules germinales fœtales, on observe l'apparition de cellules multinucléées chez le rat et la souris après une exposition *in utero* avec le DEHP et le DPB. Le DEHP augmente également l'apoptose de ces cellules. Ce dernier effet est décrit chez le rat et également retrouvé dans les cultures organotypiques de testicule fœtal humain et murin.

Chez le singe (marmouset) comme chez le rat, un retard de différenciation des cellules germinales fœtales a été rapporté mais aucun effet notable sur la prolifération des cellules de Sertoli n'est décrit.

Études chez l'animal femelle

Peu d'études se sont intéressées aux effets des phtalates sur l'appareil reproducteur des animaux femelles.

Chez le rat femelle, après exposition *in utero* et néonatale au DEHP, on observe une puberté avancée ou retardée selon le moment d'administration (pour des doses de 15 ou 150 mg/kg/j) et des modifications des taux d'hormones (œstradiol, progestérone). Une réduction de la fertilité est rapportée avec le DBP après une exposition à partir du sevrage (500 mg/kg/j).

Chez les femelles marmouset exposées au DEHP juste après le sevrage (3 mois) et jusqu'à la maturité sexuelle (18 mois), les analyses morphologiques du tractus génital femelle révèlent une augmentation du poids des ovaires et de l'utérus aux doses élevées ainsi qu'une augmentation des niveaux d'œstradiol circulant. En revanche, aucun changement significatif n'est observé en histologie dans les utérus et ovaires, si ce n'est un nombre un peu plus élevé de corps jaunes.

L'augmentation des niveaux d'œstradiol observée chez le rat comme chez le marmouset pourrait être à l'origine de l'atrophie folliculaire décrite dans l'ovaire.

Organes et tissus cibles chez la femelle

Les données chez l'animal femelle indiquent que l'ovaire est un organe cible de l'action des phtalates (DEHP, DBP). Les études *in vitro* montrent clairement une diminution de la production d'œstradiol par les cellules folliculaires ovariennes suite à l'exposition au DEHP et son principal métabolite le MEHP. L'aromatase (enzyme qui convertit la testostérone en œstradiol) pourrait être une cible directe du DEHP.

D'autres organes que l'ovaire sont également des cibles potentielles comme l'hypophyse ou l'hypothalamus au niveau cérébral ou encore l'utérus et la glande mammaire comme en témoignent quelques études *in vitro*.

Études chez les poissons

Chez le poisson zèbre (zebrafish) mâle, une exposition au DEHP induit une réduction du succès de fécondation d'œufs pondus par des femelles non traitées et des anomalies de la spermatogénèse (suggérant que la progression de la méiose pourrait être perturbée). D'autres effets sont fréquemment observés après un traitement au BBP : une altération de la qualité (mobilité, forme) des spermatozoïdes, une faible quantité d'ovotestis (gonade comprenant à la fois des aspects de testicule et d'ovaire), des anomalies histologiques de la gonade mâle, des anomalies de la différenciation des testicules.

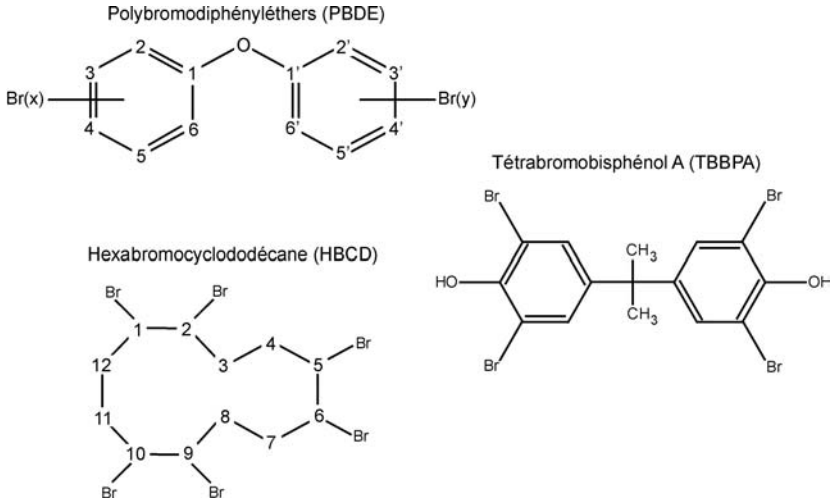
Chez le zebrafish femelle, les effets observés après traitement par le DEHP sont plus évidents que ceux décrits chez le mâle : diminution forte du nombre

d'ovocytes matures, altération de la croissance des ovocytes, de leur maturation, de l'ovulation elle-même et plus généralement de la capacité à produire des embryons.

Composés polybromés (retardateurs de flamme)

Il existe aujourd'hui de nombreux types de retardateurs de flamme, agissant soit par voie chimique soit par voie physique. Ceux-ci sont incorporés dans les produits et matériaux concernés (textiles, rideaux, vêtements, sièges, plastiques, mousses, capitonnages, résines, circuits imprimés, câbles, téléviseurs, ordinateurs...) à des teneurs allant en général de 5 à 20 %.

Les retardateurs de flamme chimiques appartiennent à différentes familles dont les plus utilisées sont les composés polybromés (RFB) tels que les polybromodiphényléthers (PBDE), le 1,2,5,6,9,10 hexabromocyclododécane (HBCD) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA). Ils représentent 30 % des retardateurs de flamme au niveau européen.



Structures chimiques des principales familles de retardateurs de flamme bromés

Du point de vue de leur structure chimique, les PBDE sont des éthers aromatiques bicycliques. Leur classification s'appuie sur le nombre et la position des atomes de brome dans le cycle. Pour les différencier, la nomenclature usuelle consiste à les désigner par un nombre donnant des informations sur le degré de bromation (nombre d'atomes de brome dans la molécule) et sur la position des atomes de brome sur les cycles benzéniques.

Depuis août 2004, la règlementation européenne interdit les deux mélanges « techniques » de PBDE utilisés industriellement, l'octa-BDE et le penta-BDE, mais autorise toujours le deca-BDE. Ce dernier est essentiellement

constitué de BDE 209 ou décabromodiphényléther, celui-ci pouvant se décomposer en congénères plus faiblement bromés par dégradation physique (notamment sous l'influence des rayonnements UV).

Le TBBPA a une structure chimique proche de celle du BPA, avec deux cycles aromatiques liés par un pont carbone. La présence de deux groupements hydroxyles rend ce composé plus polaire que les autres représentants de la famille des retardateurs de flamme bromés, et le distingue donc sur le plan des propriétés physico-chimiques. Le TBBPA est en particulier moins bioaccumulable dans les tissus gras et plus sujet aux réactions de métabolisme de phase II (conjugaison) que les PBDE.

L'HBCD occupe la troisième place au classement des retardateurs de flamme bromés les plus utilisés. L'HBCD « technique » est un mélange principalement constitué de trois diastéréoisomères (composés identiques sauf sur le plan de la disposition spatiale de leurs atomes). C'est l'isomère γ que l'on retrouve de façon prédominante dans les échantillons biologiques d'origine animale.

Les retardateurs de flamme polybromés se caractérisent globalement par des propriétés physico-chimiques qui les rendent lipophiles et bioaccumulables, au même titre que certains autres polluants organiques persistants (POP) halogénés (dioxines, polychlorobisphényls).

Bien que la production de certains RFB (notamment mélanges Penta-BDE et Octa-BDE) ait été stoppée dans certains pays dont l'Europe, leur présence s'est accrue ces dernières décennies dans l'environnement, dans la faune, mais également chez l'Homme.

Il n'y a pas à l'heure actuelle de DJT définie par les Agences sanitaires. Les évaluations sont en cours. À titre d'indication, les valeurs de référence émises par l'agence américaine (US-EPA) sont de 0,1 µg/kg pc/j pour le BDE 99 et de 7 µg/kg pc/j pour le BDE 209.

Exposition

En raison du caractère lipophile de ces polluants, les produits alimentaires riches en lipides (viande, poisson, lait) contribuent de façon majeure à l'exposition de l'Homme aux retardateurs de flamme bromés. Toutefois, les habitudes alimentaires très diverses d'un continent à l'autre expliquent une disparité observée parmi les principaux contributeurs à l'exposition.

Les voies d'exposition aérienne (par l'ingestion de poussières) et directe (par contact avec certains matériaux plastiques) représentent d'autres voies d'exposition aux congénères les plus hautement bromés comme le BDE 209, en particulier chez les jeunes enfants.

En population générale, les niveaux d'exposition aux PBDE estimés sont de l'ordre de 1 ng/kg de poids corporel/jour.

La présence de plusieurs congénères dans certains fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum ou le lait maternel, les teneurs observées sont de l'ordre de quelques ng/g de lipide.

Depuis le début des années 2000, une tendance à une diminution des niveaux d'imprégnation a été rapportée pour les principaux congénères de type PBDE, correspondant à un arrêt de la production et de l'utilisation des deux mélanges industriels Penta- et Octa-BDE. En revanche, cette diminution ne semble pas concerner les autres composés toujours utilisés, en particulier le BDE 209, l'HBCD ou encore le TBBPA, mais pour lesquels les données disponibles sont limitées. D'après les rapports d'évaluations disponibles, les niveaux d'exposition à l'HBCD sont de 2 à 10 ng/kg/jour pour l'exposition provenant des poussières de textiles et de 20 ng/kg/jour via l'alimentation. Pour le TBBPA, le niveau d'exposition est de 80 ng/kg/jour via l'environnement.

Les études conduites chez le rat indiquent qu'après administration orale le BDE 209 est éliminé principalement dans les fécès alors que l'élimination urinaire est négligeable. La demi-vie du BDE 209 est estimée à 2 jours chez le rat et 14 jours chez l'homme. Globalement, les demi-vies des PBDE varient de quelques semaines (BDE 209) à quelques années (BDE 47). Pour les différents congénères, des métabolites hydroxylés se forment et des conjugués sulfates et glucuronides sont éliminés dans l'urine.

Études épidémiologiques

Les seuls composés bromés analysés sont les PBDE. L'étude de la cohorte mère-enfant finlandaise et danoise rapporte une relation entre cryptorchidie observée chez les nouveau-nés et 7 composés de la famille des PBDE mesurés dans le lait maternel recueilli entre 1 et 3 mois. Les auteurs indiquent également une augmentation des taux de l'hormone luthéinisante (LH). Dans une autre cohorte mère-enfant en Californie, une augmentation du délai pour concevoir a été notée chez certaines femmes en relation avec les taux sanguins plus élevés de PBDE. Cependant, ces études sont encore trop peu nombreuses pour constituer une preuve suffisante d'un rôle des PBDE sur la santé reproductive de l'homme et de la femme. Aucune étude n'a pris en considération les expositions à d'autres retardateurs de flamme polybromés (HBCD et TBBPA).

Études chez l'animal

Les études animales disponibles sont très peu nombreuses et la plupart proviennent du même laboratoire.

Chez le rat mâle, avec les composés BDE 99 et 209 (500 et 1 500 mg/kg/jour) après exposition *in utero*, des anomalies ont été observées : diminution de la distance anogénitale, altération de la production spermatique et de certains paramètres fonctionnels spermatiques, diminution des taux de testostérone.

Chez le rat femelle, une diminution du nombre de follicules ovariens a été rapportée avec ces mêmes composés. Les doses utilisées (1 à 10 mg/kg en sous-cutané) sont cependant très supérieures aux expositions estimées chez l'homme.

Organes et tissus cibles

Chez la femelle, l'ovaire est un organe cible. Sur une culture de cellules isolées de truie (ou en co-culture), en présence d'un mélange de PBDE, il est montré, une modification stable après 48 h des taux de testostérone et progestérone susceptibles d'engendrer une lutéïnisation prématurée des follicules pré-ovulatoires. Après une exposition chronique des rates à HBCD (140 mg/kg/jour), une étude rapporte, à l'examen histologique des ovaires, une diminution d'un tiers des follicules primordiaux constituant la réserve des follicules de l'ovaire. Une diminution du nombre de follicules primordiaux est considérée comme un biomarqueur des effets adverses sur la reproduction femelle, car non réversible. Cependant, ces animaux femelles ont un nombre normal d'implantations au cours de leur première gestation. Une étude sur une période plus longue de la vie de l'animal permettrait de voir si la diminution de la réserve folliculaire entraîne une insuffisance ovarienne précoce.

Chez le mâle, l'organe cible est le testicule. Chez la souris, l'exposition au BDE 209 (500 et 1 500 mg/kg/jour) entraîne une modification du potentiel membranaire mitochondrial des spermatozoïdes épididymaires et de l'amplitude de déplacement latéral de la tête suggérant un stress oxydatif. Des études *in vitro* avec TBBPA sur les cellules de Sertoli de souris ont montré une mort cellulaire en partie par apoptose, impliquant une dépolarisation mitochondriale Ca^{2+} dépendante. Ces effets se produisent à des concentrations environ 100 fois plus élevées que les plus hauts niveaux de TBBPA mesurés chez l'homme.

Composés perfluorés

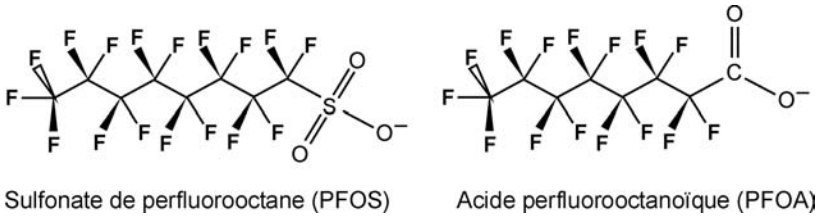
Le terme « composés perfluorés » (PFC) se réfère à une vaste famille de molécules chimiques comprenant des oligomères et des polymères. Il s'agit de composés tensio-actifs, neutres ou anioniques, présentant une grande stabilité sur les plans thermique, chimique et biologique.

Les composés perfluorés ont été ou sont utilisés dans de nombreuse applications industrielles, notamment pour les traitements anti-taches et imperméabilisants de textiles (vêtements, tissus, tapis, moquettes...), les enduits résistants aux matières grasses, les emballages en papier et/ou carton autorisés pour le contact alimentaire, les revêtements anti-adhésifs, les mousses anti-incendie, les tensioactifs utilisés dans l'exploitation minière et les puits de pétrole, les cires à parquet, ou encore certaines formulations d'insecticides. En conséquence, les consommateurs des pays industrialisés sont aujourd'hui en

contact avec ces composés dans leur vie quotidienne, à travers un grand nombre de produits manufacturés. Comme beaucoup d'autres polluants chimiques d'origine anthropique, les composés perfluorés peuvent être relargués dans l'environnement à chaque étape de leur cycle de vie, puis retrouvés dans la chaîne alimentaire et *in fine* dans les organismes vivants.

Un sous-groupe important au sein de cette famille de polluants chimiques émergents depuis quelques années, est celui des tensio-actifs organiques tels que le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), qui présentent une chaîne carbonée à huit atomes de carbone. Ces deux substances étant les principaux produits de dégradation finaux de nombreux composés perfluorés, elles sont retrouvées de façon généralement prépondérante dans les matrices environnementales ou biologiques, et sont le plus souvent les seules étudiées.

Par leur structure chimique comportant d'une part une chaîne carbonée polyfluorée apolaire et d'autre part un groupement fortement polaire, les PFC se caractérisent par des propriétés à la fois hydrophobes et lipophobes, et de ce fait ne s'accumulent pas dans les tissus adipeux. La demi-vie du PFOS et du PFOA est toutefois de plusieurs années chez l'Homme. Le PFOS a été récemment inclus dans la liste des polluants persistants de la convention de Stockholm (UNEP *United Nations Environment Programme*[32]). Depuis 2006, le PFOS est interdit dans certains usages par la réglementation européenne.



Structures chimiques du PFOS (sulfonate de perfluorooctane) et du PFOA (acide perfluorooctanoïque)

Dans son rapport scientifique rendu public en 2008, le panel Contam de l'EFSA a établi une valeur de dose journalière tolérable pour le PFOS égale à 0,15 µg/kg/jour et pour le PFOA de 1,5 µg/kg/jour.

Exposition

La source alimentaire apparaît comme la voie d'exposition principale aux composés perfluorés, en particulier pour l'adulte. D'autres sources notamment

32. http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Publications/tabid/345/language/fr-CH/Default.aspx

via le contact direct avec certains revêtements de type tapis ou moquette, représentent toutefois une voie non négligeable d'exposition pour les jeunes enfants. De façon générale, les valeurs estimées d'exposition aux composés perfluorés varient de quelques ng à quelques dizaines de ng/kg/jour. Elles apparaissent en deçà des limites tolérées pour l'adulte en population générale mais proches des limites pour des sous-populations particulièrement exposées. Pour les gros consommateurs de poisson, l'apport alimentaire en PFOS via le poisson a été estimé à 0,2 µg/kg/jour.

La présence de plusieurs représentants de cette classe de composés dans des fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum, les teneurs observées sont de l'ordre de quelques ng à quelques dizaines de ng/ml. Le PFOS et le PFOA apparaissent comme étant deux principaux biomarqueurs d'exposition aux composés perfluorés.

Une tendance à la diminution des niveaux d'imprégnation en population générale est observée aux États-Unis depuis 2002, date correspondant à l'arrêt de la production d'une des principales sociétés productrices. En revanche, l'absence de données concernant les autres pays ne permet pas de généraliser cette observation.

Plusieurs études ont fait état d'un transfert mère-fœtus via le sang du cordon. Toutefois, les niveaux de concentration rapportés dans le sang du cordon sont systématiquement inférieurs aux teneurs observées dans le sang maternel (d'un facteur 1,5 à 3,5). L'existence d'une exposition du nourisson allaité via le lait maternel est de même démontrée, même si cette voie de transfert de la mère à l'enfant apparaît plus limitée que pour d'autres classes de polluants organiques halogénés tels que les dioxines, les PCB, ou les retardateurs de flamme bromés.

Les demi-vies plasmatiques estimées pour le PFOS et le PFOA sont de l'ordre de quelques heures chez le rongeur, quelques jours chez le primate et quelques années chez l'homme. Parmi les polluants bioaccumulables, ils sont moins persistants que d'autres substances plus lipophiles tels les dioxines ou les PCB. Une élimination plus rapide chez la femelle a été montrée chez l'animal, cette différence étant toutefois moins significative dans l'espèce humaine. Par ailleurs, on observe une importante variabilité inter et intra-espèce des paramètres pharmacocinétiques selon les composés et en particulier selon la longueur de la chaîne carbonée, les composés à plus longue chaîne présentant un caractère plus persistant.

Études épidémiologiques

Le nombre d'études concernant les effets potentiels du PFOA et du PFOS sur la fonction de reproduction humaine est très limité. Une étude réalisée sur une cohorte de naissance danoise rapporte une association entre les taux plasmatiques de PFOS et PFOA et la fertilité des couples (augmentation du

risque d'infécondité involontaire). Une autre étude danoise suggère un lien entre les taux cumulés de PFOS et PFOA et une modification de la morphologie spermatique.

Études chez l'animal

Des études menées sur deux générations indiquent que, même à de très fortes doses, le PFOA ne modifie pas la fertilité des rats mâles. Il s'agit de doses 30 000 fois plus fortes que les concentrations mesurées chez l'être humain. Il n'a pas été rapporté d'effet néfaste du PFOA ou PFOS sur la production spermatique des rongeurs. Il faut souligner les différences interespèces pour les durées de demi-vie et le métabolisme en particulier entre l'homme et les rongeurs.

Chez le rat, deux études concernant le PFDoA (acide perfluorododécanoïque) administré par gavage indiquent une diminution de la production de testostérone (avec réduction de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse de la testostérone) dès la dose de 0,2 mg/kg/j. Plus de 40 protéines (impliquées dans le stress oxydatif et la chaîne respiratoire mitochondriale) sont modifiées dans les testicules de rats traités de manière chronique.

Les composés perfluorés (PFOA et PFOS) ne semblent pas modifier la fertilité femelle ou la morphologie ovarienne mais peuvent altérer la stéroïdogenèse ovarienne. Chez la souris, on observe un retard de la maturité sexuelle des femelles traitées (10 mg/kg/jour) *in utero* : l'âge de l'ouverture vaginale et celui du premier œstrus est retardé. Un effet sur la régularité des cycles oestriens est rapporté avec le PFOS (1 à 10 mg/kg/jour) administré à des rates adultes. Ces effets apparaîssent variables en fonction de l'espèce (rat ou souris).

Organes et tissus cibles

Dans le testicule de rat adulte après traitement par le PFDoA, la diminution de la production de testostérone est associée à une augmentation de l'apoptose dans les différents types de cellules.

Chez la souris, plusieurs travaux montrent des effets du PFOA sur le développement ou la différenciation de la glande mammaire (augmentation du nombre de bourgeons terminaux). Ceci serait en relation avec l'augmentation de la synthèse de la progestérone ovarienne sous l'effet du PFOA. Des différences selon les lignées de souris sont rapportées.

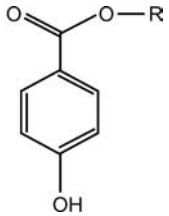
D'une façon générale, les effets des composés perfluorés dépendent de leur structure chimique et varient selon l'espèce (rat, souris) ou la lignée.

Chez le vairon mâle adulte, une augmentation de la vitellogénine a été observée après traitement au PFOA. Des signes d'ovotestis ont également été observés, ce qui suggère clairement une activité œstrogénique. Chez les femelles

traitées par du PFOS, une étude décrit une diminution de la croissance de la gonade et une altération du développement des embryons pondus par ces femelles. Par ailleurs, le PFOS induit des anomalies histologiques des ovaires chez les femelles traitées.

Parabènes

Les parabènes sont des esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, présentant un cycle benzénique substitué en para par un groupement ester avec des chaînes alkyles de taille variable. Les structures les plus courantes sont : méthyl parabène, éthyl parabène, propyl parabène, butyl parabène, benzyl parabène.



Structure chimique de base des parabènes
R = chaîne alkyle (méthyl, éthyl, propyl, butyl, ...)

En raison de leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, les parabènes sont très largement utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments. Leur première utilisation en tant que conservateur remonte à 1920.

Les composés de la famille des parabènes autorisés comme additifs alimentaires sont : le méthyl parabène (E218) et son sel de sodium (E219) et l'éthyl parabène (E214) et son sel de sodium (E215). Leur emploi en tant qu'additifs alimentaires est régi par la directive européenne 95/2/CE du 20 février 1995.

Les parabènes les plus utilisés en cosmétique sont le méthyl, l'éthyl, le propyl, le butyl et l'isobutyl parabène. La directive 76/768/CEE régit l'utilisation des parabènes dans les produits cosmétiques et fixe leur emploi à 0,4 % (en acide) pour un ester et 0,8 % (en acide) pour les mélanges d'esters. Dans les médicaments, c'est le propyl parabène qui est principalement utilisé.

Les autorités sanitaires européennes (EFSA) ont défini une dose journalière tolérable pouvant aller jusqu'à 10 000 µg/kg/jour pour le mélange méthyl et éthyl parabènes.

Exposition

Du fait de leur emploi comme conservateurs dans plus de 80 % des produits cosmétiques (shampooings, crèmes hydratantes, mousses à raser...), dans de

nombreuses spécialités pharmaceutiques, et comme additif alimentaire, l'être humain est régulièrement exposé aux parabènes.

L'exposition aux méthyl, éthyl, propyl, et butyl parabènes a été évaluée dans un échantillon représentatif de la population générale des États-Unis (personnes âgées de 6 ans et plus) entre 2005 et 2006. Le méthyl et le propyl parabène ont été détectés dans plus de 90 % des échantillons, l'éthyl et le butyl dans un peu moins de 50 %. La concentration médiane du méthyl parabènes était de 63,5 µg/l d'urine et celle du propyl parabène de 8,7 µg/l. Les adolescentes et les femmes adultes avaient des concentrations significativement plus fortes que les adolescents et hommes adultes.

Une estimation à partir des différentes sources possibles d'exposition indique un taux de 1 300 µg/kg/jour pour la population américaine.

La confirmation de la capacité des parabènes d'être absorbés systématiquement à partir d'applications topiques a été démontrée chez l'homme. Le n-butyl parabène est détecté dans le sérum en 1 h et dans l'urine avec un pic à 8-12 h, dont la majorité conjuguée sous forme de glucuronide.

Études épidémiologiques

En ce qui concerne le butyl parabène, une étude menée chez une centaine d'hommes consultant pour infertilité a montré que sa présence dans le sérum est significativement associée aux altérations de l'ADN des spermatozoïdes. Une relation dose dépendante est observée avec l'augmentation de la fragmentation de l'ADN. Cependant, les données épidémiologiques sont insuffisantes pour confirmer l'impact des parabènes sur la qualité spermatique.

En 2004, la mise en évidence des cinq parabènes les plus utilisés (méthyl, éthyl, n-propyl, n-butyl et isobutyl parabènes) dans la graisse de carcinomes mammaires a déclenché un débat scientifique et sociétal concernant l'effet possible de certains composés de la famille des parabènes utilisés en application cutanée locale sous les aisselles (notamment du fait de leur présence dans les déodorants) sur le risque de survenue de cancer du sein. Cette étude a été critiquée du fait qu'elle comportait peu d'échantillons et pas de témoins.

Par ailleurs, deux études épidémiologiques (2002, 2003) n'apportent pas d'éléments concernant l'impact possible des parabènes présents dans les déodorants ou anti-transpirants sur la survenue de cancer du sein. La première, une étude cas-témoins, ne rapporte aucune augmentation du risque associé à l'usage de déodorants/antitranspirants. La seconde constate seulement chez les femmes ayant un cancer du sein, une relation entre l'âge de survenue de ce cancer et la précocité de l'utilisation des déodorants/antitranspirants (associée au rasage). Aujourd'hui, les résultats disponibles ne sont donc pas en mesure de répondre à la question.

Études chez l'animal

Concernant le méthyl parabène, une étude menée par un consortium industriel a confirmé récemment l'absence d'effet sur les organes reproducteurs mâles après administration par voie orale chez le rat juvénile (1 000 mg/kg/jour).

Pour le propyl parabène, un effet sur la spermatogenèse sans altération du poids des organes reproducteurs mâles a été rapporté : diminution de la quantité testiculaire et épididymaire de spermatozoïdes (environ 50 % des témoins à la dose de 1 000 mg/kg/jour) ; diminution de la production journalière de spermatozoïdes dans tous les groupes (environ 70 % des témoins) ; diminution dose dépendante de la concentration sérique en testostérone. Cette étude a été critiquée dans de nombreuses évaluations des agences sanitaires, en raison du faible nombre d'animaux utilisés, du manque de détails fournis, de variations importantes dans les poids des animaux, et dans les dosages hormonaux... Il faut également noter que la durée de l'étude ne couvre pas un cycle complet de spermatogenèse (52 jours chez le rat).

Concernant le butyl parabène, une étude récente chez le rat menée dans des conditions expérimentales satisfaisantes, a montré l'absence d'effet sur les organes reproducteurs mâles. Chez la souris, aucun effet du butyl parabène n'a été décrit sur le poids de la prostate, des vésicules séminales, et des glandes préputiales. Cependant, le poids de l'épididyme apparaît légèrement augmenté à la dose la plus forte (1 000 mg/kg/jour). Une diminution dose dépendante des spermatides dans les tubes séminifères, sans modification du nombre des spermatogonies et spermatocytes, est observée. La testostérone sérique est significativement diminuée à la dose de 1 000 mg/kg/jour.

Quelques études ont analysé l'effet des parabènes sur les paramètres reproducteurs de la femelle. Une étude récente indique qu'une forte dose de méthyl et d'isopropyl parabène (1 000 mg/kg/jour) entraîne un retard significatif dans la survenue de l'ouverture vaginale (signe de la puberté chez les rongeurs femelles) ainsi qu'une diminution de la longueur de l'œstrus. Cette forte dose des deux composés est responsable d'une diminution du poids des ovaires, d'un manque de corps jaune, et d'une augmentation du nombre de follicules kystiques. L'analyse histologique révèle des anomalies au niveau de l'utérus, à savoir une hypertrophie du myomètre, pour la dose la plus élevée de propyl et d'isopropyl parabène (1 000 mg/kg/jour) et pour toutes les doses de butyl and isobutyl parabène (62,5, 250, 1 000 mg/kg/jour). Les niveaux d'œstradiol sont significativement réduits chez les animaux traités par méthyl, éthyl, propyl, isopropyl et isobutyl parabènes. Les autres études montrent principalement une augmentation du poids de l'utérus.

Bilan et limites des études chez l'homme et l'animal

Les études épidémiologiques ayant recherché des liens entre les cinq familles chimiques analysées dans cette expertise (bisphénol A, phtalates, composés

polybromés, composés perfluorés, parabènes) et des anomalies de l'appareil reproducteur mâle et femelle, des troubles de la fonction de reproduction et la fertilité dans l'espèce humaine sont encore trop peu nombreuses à ce jour pour permettre de conclure sur les effets de l'exposition à ces composés relativement récents. Dans l'attente de nouvelles études épidémiologiques, l'expérimentation animale reste une source précieuse de données.

Des études chez l'animal en particulier le rat et la souris (parfois le primate non humain) réalisées dans différents contextes ont rapporté des effets sur l'appareil reproducteur mâle et femelle, sur la production et la qualité des spermatozoïdes et quelquefois sur la fertilité. Dans les études ayant montré des effets, la période d'exposition *in utero* et jusqu'au sevrage apparaît comme celle la plus critique. Certains effets sont associés à des périodes d'exposition très précises (en termes de jours) en fin de gestation par exemple (phtalates). Des modifications dans les taux d'hormones comme la testostérone, dont le rôle est essentiel dans la masculinisation du tractus génital, peuvent redevenir normaux à l'âge adulte. À l'inverse, d'autres effets précoces peuvent donner lieu à des conséquences pathologiques à distance de l'exposition.

Un des premiers paramètres compliquant l'analyse des effets des substances chimiques potentiellement « reprotoxiques » est leur spécificité d'action en fonction du stade de développement. Par exemple, certaines substances affectent plus fortement ou spécifiquement la gonade fœtale en comparaison de la gonade adulte. Il est même possible d'observer des différences d'effet à quelques jours d'écart au cours du développement de la gonade fœtale.

Types d'effets au niveau cellulaire des différentes substances chimiques

La perturbation de processus au niveau cellulaire peut être à l'origine des troubles de la fertilité ou bien expliquer la survenue de lésions précancéreuses. Les effets des substances chimiques peuvent s'exercer sans modifier les hormones en agissant directement sur certains types cellulaires via leur différenciation, prolifération, interaction et survie.

Apoptose ou mort cellulaire programmée

Dans le cas du développement des gonades, plusieurs substances chimiques sont suspectées d'augmenter l'apoptose au sein de la lignée germinale, ce qui conduit à une diminution du nombre de ces cellules et donc du potentiel reproducteur d'un individu. Ce processus, s'il n'est pas compensé par la prolifération des cellules survivantes, peut entraîner une diminution du nombre de gamètes et donc une hypofertilité. Le bisphénol A et certains phtalates peuvent augmenter l'apoptose des cellules germinales mâles au cours du développement.

À l'inverse, une diminution de l'apoptose peut avoir des conséquences pathologiques. Ainsi, l'apparition ou le développement de lésions « précancéreuses » sont parfois attribués à un défaut d'apoptose. Cette hypothèse a été émise dans le cas des souris femelles exposées au bisphénol A en fin de vie fœtale ou au moment de la puberté, concourant au développement de lésions observées plus tard dans les glandes mammaires.

Par ailleurs, l'effet sur l'apoptose peut varier selon l'âge ou le stade de développement. Chez la souris, le MEHP (métabolite de phtalate) augmente l'apoptose des cellules germinales fœtales mâles à 13,5 et à 18,5 jours post-conception mais il a très peu d'effet, à dose équivalente, à 15,5 jours post-conception. De telles fenêtres d'action très spécifiques sont couramment décrites pour la gamétogenèse et la stéroïdogenèse fœtale (conduisant à la masculinisation).

Prolifération cellulaire

Un dérèglement de la prolifération cellulaire peut également induire des troubles de la fertilité ou être suspecté dans la survenue de cancers. Le bisphénol A stimule la prolifération de cellules séminomateuses humaines. Des phtalates (tels que le DBP) sont capables de diminuer la prolifération des cellules de Sertoli chez le rat et l'on sait que de celle-ci dépend la réserve spermatique de l'adulte.

Différenciation cellulaire

Chez le mâle, dans la lignée germinale, les cellules en division mitotique (cellules souches germinales fœtales ou adultes) expriment de nombreux marqueurs de cellules souches. Au moment de la différenciation de ces cellules, celles-ci perdent ces marqueurs de pluripotence. Le blocage de la différenciation de cellules germinales fœtales est corrélé à la survenue de tumeurs testiculaires. Il a été proposé que des phtalates (DBP) bloquent ou retardent la différenciation des cellules germinales fœtales mâles chez le rat. Cependant, il n'a pas été retrouvé de cancers testiculaires chez les rats exposés aux phtalates, peut-être en raison de la rareté de ce type de cancer chez les rongeurs en dehors de certains fonds génétiques très spécifiques.

Chez la femelle, le recrutement accéléré des follicules primordiaux suite à une exposition au bisphénol A, et leur engagement prématuré vers des stades de différenciation ultérieur vont entraîner une diminution du stock de gamètes et aboutir à une ménopause prématurée. Enfin, il a été montré chez l'animal dans les deux sexes des altérations de la différenciation des neurones hypothalamiques ayant des conséquences à long terme sur la sécrétion des hormones gonadotropes à la puberté et à l'age adulte.

Mécanisme d'action : modification de la fonction hormonale (perturbation endocrinienne)

La plupart des substances chimiques qui font l'objet de cette expertise sont citées comme des perturbateurs endocriniens. Plusieurs définitions sont proposées pour les perturbateurs endocriniens. Selon la Commission européenne, un perturbateur endocrinien est une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets pathologiques sur l'organisme ou sur sa descendance à la suite d'une modification de la fonction hormonale (*European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife*, Weybridge, UK, 1996). Selon l'Agence américaine de l'environnement (EPA), un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme. La définition américaine ne fait pas mention d'un effet pathologique sur l'organisme ou sa descendance.

La première définition pose des difficultés méthodologiques car elle impose de connaître à la fois l'impact d'une substance au niveau fondamental et de vérifier que cette substance a un effet sur la survenue de pathologie passant par ce mécanisme. Or, parmi les nombreux mécanismes d'actions potentiels des perturbateurs endocriniens, seuls quelques uns ont été associés à des « phénotypes » au niveau de l'appareil reproducteur.

L'action des substances chimiques sur la reproduction peut être directe ou indirecte selon que ces substances agissent sur les gonades ou sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui contrôle les sécrétions hormonales gonadiques. Elles peuvent agir à ces deux niveaux mais aussi sur d'autres organes tels que la thyroïde qui aura un effet, par exemple, sur la fonction testiculaire.

La majorité des études se focalise sur la liaison des substances aux récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes (ER et AR) perturbant ainsi la liaison des ligands naturels que sont les hormones. Les effets peuvent être de type œstrogénique ou anti-androgénique. Les substances de type œstrogènes peuvent causer des anomalies structurelles ou fonctionnelles chez le mâle et la femelle au cours du développement alors que les substances de type androgènes affectent essentiellement les femelles et les anti-androgènes essentiellement les mâles.

Un effort de recherche important a été mis en œuvre pour la caractérisation des substances altérant la signalisation des récepteurs nucléaires « canoniques » aux œstrogènes et aux androgènes.

Activité hormonale potentielle des 5 familles étudiées

Activité hormonale	Agoniste	Antagoniste
Œstrogénique	BPA, Phtalates, Parabènes	
Androgénique		Phtalates, BPA, Parabènes
Thyroïdienne		TBBPA

Cependant, d'autres modes d'actions sont possibles via des récepteurs hormonaux moins classiques (formes membranaires de ces récepteurs nucléaires, GPR30), via d'autres récepteurs nucléaires orphelins tels que ERR ou PXR ou CAR responsables de l'induction de système enzymatique pour l'élimination des substances exogènes, ou encore via les récepteurs contrôlant l'activation de la prolifération des peroxysomes (PPAR).

Selon la dose, les substances chimiques peuvent avoir des affinités différentes pour les récepteurs, ce qui peut expliquer les courbes de liaison ou d'activité en U inversé, et peuvent agir par différents mécanismes d'action.

Les récepteurs nucléaires sont au cœur de la régulation de nombreux réseaux de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, le developpement, l'homéostasie et le métabolisme.

Cependant, dans de nombreux cas, une altération du poids ou de la structure des organes reproducteurs, ou encore de la prolifération des cellules, ou de la sécrétion hormonale d'un tissu, est rapportée sans que le mécanisme d'action n'ait été élucidé. Ceci est en partie dû au fait que la connaissance fondamentale, y compris sur les fonctions des récepteurs nucléaires, est encore incomplète.

L'effet sur les voies de signalisation des hormones thyroïdiennes, importantes pour la taille des testicules et la production spermatique (prolifération des cellules de Sertoli) ou des rétinoïdes, acteurs centraux de la détermination du sexe des cellules germinales, est très peu étudié.

Par ailleurs, une substance peut agir sur plusieurs voies de signalisation comme par exemple la signalisation stéroïdienne et la signalisation rétinoïdienne par la liaison à un même récepteur (SHP, *short heterodimer partner*).

Bisphénol A

Le bisphénol A est un agoniste faible des œstrogènes pouvant se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β (ERα et β). L'affinité du bisphénol A pour ERα et β est plusieurs milliers de fois plus faible que celle de l'œstradiol. Certaines études *in vitro* ont montré que le bisphénol A a des effets anti-androgéniques et peut se lier au récepteur des androgènes (AR) mais les preuves d'effets anti-androgéniques *in vivo* chez l'animal sont rares. Plus récemment, des liaisons du bisphénol A à d'autres récepteurs nucléaires ou membranaires ont été décrites.

Récepteurs nucléaires impliqués pour les différentes substances étudiées

	BPA	Phtalates (DEHP, DBP...)	Retardateur de flamme (PBDE, TBBPA, HBCD)	Perfluorés (PFOA, PFOS)	Parabènes
ER	(+)	(+)	(+) (-)		(+)
AR	(-)	(-)	(+) (-)		(-)
PPAR α ou γ		(+)	(+) pour TBBPA	(+)	
PXR	(+)	(+)	(+) (-)		
ERRγ	(+)				
TR			(+) (-)		
CAR		(+)		(+)	

(+) : agoniste ; (-) : antagoniste
ER : récepteur aux œstrogènes ; AR : récepteur aux androgènes ; PPAR : récepteur contrôlant l'activation de la prolifération des peroxysomes ; PXR : *pregnan X receptor* ; ERR : *estrogen related receptor* ; TR : récepteur aux hormones thyroïdiennes ; CAR : *constitutive activated receptor*

Bien que les affinités de liaison ne soient pas très fortes (excepté pour GPR30 si l'interaction est confirmée), des synergies d'action entre récepteurs nucléaires (récepteurs ERα, ERβ et AR) pourraient expliquer les effets à faible dose. De plus, le fait que le bisphénol A se lie à des formes membranaires des récepteurs des œstrogènes suggère qu'il pourrait également interagir avec des formes membranaires d'autres récepteurs nucléaires comme AR, TRα ou β.

La présence d'un groupement aromatique hydroxylé (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe, caractéristiques essentielles pour l'activité œstrogénique, se retrouvent dans les bisphénols. Par ailleurs, la nature des substituants liés au pont carbone est importante pour déterminer l'activité œstrogénique. Les dérivés chlorés qui peuvent se former lors du recyclage du papier thermique (par blanchissage à l'hypochlorite de sodium) ont été décrits, dans certaines études, comme 28 fois plus œstrogéniques que le bisphénol A.

Phtalates

La perturbation endocrine des phtalates semble être essentiellement due à leur activité d'agonistes des récepteurs PPAR (PPARα et PPARγ). Par cette liaison aux récepteurs PPAR, l'effet majeur des phtalates pourrait être une inhibition de l'expression de l'aromatase. Cet effet antiœstrogènique peut être partiellement compensé par l'activation des récepteurs des œstrogènes et au contraire potentialisé par l'inhibition du récepteur des androgènes. Les récepteurs des œstrogènes alpha et bêta, le récepteur des androgènes, les récepteurs des xénobiotiques CAR (*constitutive activated receptor*) et PXR (*pregnan X receptor*) ont été identifiés comme des médiateurs possibles des effets de ces molécules. Il faut noter que les divers phtalates n'ont pas le même profil d'interaction avec les différents récepteurs nucléaires. Ainsi, le MEHP est essentiellement actif sur PPARγ et n'interagit pas avec les récepteurs ER. Au contraire, le BBP et le DBP sont actifs sur ER et interagissent très peu avec

PPARγ. Des études sur des modèles de souris déficientes pour un ou plusieurs de ces récepteurs permettraient d'approfondir le mécanisme d'action de différents phtalates (MEHP *versus* BBP par exemple).

Certains phtalates présentent *in vitro*, une affinité de liaison au récepteur AR modérée, voire basse, par rapport aux stéroïdes. Deux points d'ancrage sont nécessaires pour avoir une forte interaction (type liaison hydrogène) avec le récepteur AR, et donc une activité anti-androgénique importante. En absence de ces caractéristiques chimiques, seules les interactions hydrophobes permettent une interaction avec le récepteur. Pour les phtalates, le cycle aromatique peut être impliqué dans ce type d'interaction et un deuxième cycle benzénique à distance de trois atomes de carbone du cycle principal, comme dans BBP, pourrait renforcer cette interaction.

Retardateurs de flamme polybromés

Les cibles des retardateurs de flamme (PBDE, TBBPA, HBCD) au niveau des récepteurs nucléaires ne sont pas encore complètement identifiées. Les récepteurs ER, AR, PXR semblent impliqués pour les PBDE. Les résultats de plusieurs travaux de criblage *in vitro* suggèrent que l'activité œstrogénique est associée à une faible bromation des PBDE alors que l'activité anti-œstrogénique est déterminée par un degré élevé de bromation. Les molécules substituées aux positions [2,2',6] ou [2,2',4] ont une activité ER-agoniste. De même, le modèle QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*) lie l'activité AR-antagoniste à un bas degré de bromation et aux substitutions en ortho (positions 2, 2', 6 et 6') ou ortho et para (positions 4 et 4'). Les récepteurs TR et PPAR sont des cibles du TBBPA.

Composés perfluorés

Chez l'Homme, les cibles principales des composés perfluorés semblent être les PPAR et parmi eux, PPARα et PPARγ. Les études ont montré que le récepteur PPARα est la cible principale de PFOA et PFOS bien que le récepteur PPARγ soit également activé dans une plus faible mesure.

Cependant, des expériences réalisées sur des souris déficientes en PPARα indiquent qu'une partie des gènes (5-10 %) dont l'expression est modulée par les composés perfluorés serait sous le contrôle du récepteur nucléaire CAR (*Constitutive activated receptor*). Une étude récente a montré un effet proliférateur de tumeur de PFOA qui serait également indépendant de PPARα.

Parabènes

Dès 1998, des études ont mis en évidence la capacité des parabènes à se lier au récepteur des œstrogènes (ER). Leur affinité de liaison au récepteur des œstrogènes est cependant 10 000, 30 000, 150 00 et 2 500 000 fois plus faible respectivement pour le butyl, le propyl, l'éthyl et le méthyl parabène que le ligand naturel, le 17β-œstradiol. Dans les tests *in vitro*, l'intensité de l'activité

œstrogénique mesurée augmente avec la longueur de la chaîne (méthyl<éthyl <propyl<butyl parabène). Compte tenu de leur petite taille, deux parabènes (du méthyl parabène au n-butyl parabène) pourraient entrer à l'intérieur de la poche du récepteur et donner lieu à des effets de synergie. Une très faible activité anti-androgénique a également été observée *in vitro* avec le méthyl, propyl et butyl parabène.

Autres mécanismes d'action

Depuis quelques années a émergé l'idée que les effets sur les organes reproducteurs et la fonction de reproduction des composés chimiques pouvaient s'exercer sans passer obligatoirement par la liaison à un récepteur hormonal, qu'il soit nucléaire ou membranaire.

Il a également été proposé que les composés chimiques puissent entrer en compétition pour la liaison à des protéines de transport (SHBG, *Sex hormone binding globulin*) ou altérer le métabolisme intracellulaire des hormones (aromatase), moduler l'expression des co-activateurs des récepteurs nucléaires, la dégradation de ceux-ci ou encore modifier l'expression de gènes à travers des mécanismes épigénétiques. Plusieurs études ont décrit des altérations des mécanismes épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN, qui pourraient rendre compte de la transmission aux générations futures de certains phénotypes.

Des hypothèses ont également été formulées sur l'altération du cytosquelette de certains types cellulaires et sur une action directe ciblant les cellules germinales sans passer par une perturbation stéroïdienne. Ces quelques pistes méritent d'être poursuivies et approfondies.

Nouveaux enjeux de recherches

Les méthodes d'étude des substances chimiques ayant potentiellement un impact sur la reproduction peuvent être destinées au criblage pour la caractérisation du danger et/ou à l'étude des mécanismes d'action.

Les méthodes de criblage incluent des tests *in vivo* et *in vitro*. Des méthodes d'études réglementaires ont été définies et correspondent aux lignes OCDE (Organisation de coopération et de développement économique). Les méthodes OCDE sont au nombre de 6 (plus une 7e dont la validation est en cours) en ce qui concerne l'impact des produits chimiques sur la reproduction. Les méthodes *in vitro* ne permettent pas de comprendre comment les substances chimiques sont métabolisées et stockées dans l'organisme alors que les études *in vivo* prennent en compte l'ensemble des interactions.

Dans le cadre d'un criblage, on peut structurer les méthodes d'études en deux niveaux complémentaires. À un premier niveau, des tests simples et rapides permettent d'identifier des molécules chimiques ayant un potentiel de perturbation endocrine. C'est par exemple la liaison aux récepteurs d'hormones stéroïdes. Les tests *in vitro* présentent l'avantage de travailler sur un nombre très grand d'échantillons et de respecter la règle des trois R (édictée par la législation européenne sur la protection des animaux : *reduce/replace/refine*) : réduction du nombre d'animaux ; remplacement des animaux quand cela est possible ; raffinement de la méthodologie utilisée.

À un deuxième niveau, des tests plus perfectionnés comme les cultures organotypiques et les tests *in vivo*, moins adaptés à un criblage à haut débit, sont plus informatifs sur les effets complexes mettant en jeu des interactions au niveau d'organes ou de tout l'organisme. Ces tests sont à l'heure actuelle les seuls pouvant tracer le lien avec une atteinte possible de la fertilité ou un changement pathologique.

La sélection des tests pour la prédiction d'éventuels effets délétères sur la fonction de reproduction requiert à la fois une meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux en jeu (les voies de signalisation impliquées dans les étapes clefs de la reproduction des mammifères sont loin d'être toutes identifiées) et une meilleure compréhension des mécanismes d'action des substances reprotoxiques *in situ* dans leur(s) tissu(s) cible(s).

Pour étudier ces mécanismes d'action, le développement de lignées cellulaires correspondant à divers tissus reproducteurs est important, mais pour appréhender le lien avec la fertilité il est nécessaire d'avoir recours à des modèles plus proches de la physiologie tels que les co-cultures, la culture organotypique ou l'expérimentation *in vivo*.

En complément des études *in vitro* et *in vivo*, sont apparues plus récemment les méthodes *in silico* ou « systèmes experts » qui font appel à des outils informatiques. Ces méthodes telles que les QSAR apportent des informations sur la nature des interactions chimiques entre les substances et leurs récepteurs et sont précieuses pour appréhender ces mêmes mécanismes. Par la suite, de telles études peuvent être utilisées pour mettre sur pieds de nouvelles expériences ou lors de la sélection de molécules à tester et également favoriser la recherche de substituts plus sûrs (répondant aux exigences du règlement européen REACH).

Il est souvent nécessaire de disposer d'un faisceau d'arguments pour conforter la relation entre les propriétés biologiques d'une substance chimique et son rôle dans la pathologie. Par ailleurs, la connaissance du mode d'action permet de savoir si des observations faites chez l'animal sont transposables à l'homme.

Cependant, le transfert des travaux réalisés dans des modèles *in vitro* ou à l'aide d'animaux de laboratoire à l'être humain doit tenir compte de l'hétérogénéité génétique de la population humaine. En effet, divers polymorphismes dans des acteurs clefs de la fonction de reproduction sont maintenant connus.

Des polymorphismes ont également été décrits pour les récepteurs aux androgènes (AR) et aux œstrogènes (ER) ainsi que pour SF1 (*steroidogenic factor* 1). Pour plusieurs substances chimiques notamment des phtalates, des effets très différents ont été rapportés d'une espèce à l'autre, parfois même entre deux lignées animales différentes d'une même espèce.

Peu d'études (*in vivo* comme *in vitro*) ont abordé la problématique cruciale des effets de mélanges complexes. Les effets de mélange (liés à une réalité de multi-exposition), les effets de faibles doses en condition d'exposition chronique, les relations dose-effet non conventionnelles, ou encore l'existence de cibles biologiques multiples pour une même substance, sont autant d'éléments illustrant la complexité de la problématique d'étude des substances chimiques et en particulier des perturbateurs endocriniens et de l'évaluation des risques potentiels.

De fait, les approches méthodologiques fondées sur la mesure ou le suivi d'un paramètre unique, qu'il s'agisse d'un agent chimique (caractérisation d'exposition, études métaboliques et/ou pharmacocinétiques) ou bien d'un « *endpoint* » clinique (caractérisation du danger, études pharmacodynamiques) particuliers, sont dans ce cas le plus souvent inadaptées.

Des évolutions de la toxicologie vers des approches, outils et concepts plus intégratifs se dessinent. Dans ce cadre, l'exploitation des technologies de profilage global de type « omique » représente probablement une voie d'évolution majeure pour la toxicologie dans les années à venir. Si les deux premiers niveaux de description des systèmes biologiques que sont la transcriptomique et la protéomique sont déjà assez largement utilisés, le troisième niveau qui est celui du métabolome est encore émergent. Les approches de type métabolomique s'intéressent plus particulièrement aux petites molécules (métabolites) présentes au sein des systèmes biologiques après la mise en jeu des phénomènes complexes de transcription et de traduction. L'objectif de la métabolomique est également d'identifier des biomarqueurs d'exposition aux différentes substances dans des fluides biologiques tels que le sang ou l'urine. Ainsi la recherche de ces biomarqueurs chez un individu permettrait de déterminer s'il a été exposé à un moment de sa vie et de prédire les conséquences de cette exposition sur sa fertilité.

La mesure de ces biomarqueurs dans le cadre des études épidémiologiques constitue une source de données importantes sur les niveaux d'exposition des populations aux polluants environnementaux. Les approches de type cohorte prospective, adossées à d'importantes biothèques, ont l'avantage de permettre d'étudier simultanément différents paramètres de santé et d'évaluer de façon prospective l'exposition aux substances chimiques. De même, il faut souligner l'intérêt des cohortes mères-enfants permettant de suivre à moyen et long terme la santé de l'enfant et sa sensibilité aux expositions subies durant la vie intra-utérine.

Les approches par des disciplines complémentaires et l'interaction entre les épidémiologistes, physiologistes, toxicologues et biologistes de la reproduction devraient conduire à une vision plus intégrée des effets des substances et devraient permettre de répondre aux défis sociétaux de la santé reproductive grâce à un ensemble de méthodologies :

- approches classiques d'étude de l'absorption, distribution et métabolisme des toxiques ;
- utilisation de modèles biologiques cellulaires proches des états physiologiques humains (organotypique) et prise en compte de l'intervariabilité individuelle (cellules iPS) ;
- utilisation de modèles animaux pertinents (souris transgéniques mutantes pour un récepteur) permettant d'appréhender les mécanismes d'action sur les tissus cibles ; ou de mammifères non rongeurs ou encore d'animaux transgéniques humanisés plus représentatifs de la situation humaine ;
- exploration de la perturbation des voies de biosynthèse des hormones naturelles pour identifier les différents niveaux de modification avec des outils de quantification ;
- biologie structurale qui permet de comprendre les interactions des substances avec leurs cibles protéiques cellulaires ;
- techniques haut débit, génomique, protéomique, métabolomique qui permettent une analyse à grande échelle des effets moléculaires potentiels et de rechercher des biomarqueurs d'expositions multiples ;
- application des outils de la biochimie et de la biologie moléculaire aux biothèques constituées dans le cadre des cohortes épidémiologiques ;
- biologie de systèmes qui permet d'intégrer ces informations dans un modèle mathématique global et de prédire les effets à long terme ;
- prise en compte des multi-expositions et utilisation d'indicateurs sensibles et faciles à obtenir comme le spermatozoïde ou la durée nécessaire pour avoir un enfant.

Communication

Études de toxicologie *in vivo*[1]

L'évaluation des effets des substances ou produits chimiques sur le développement est réalisée à partir d'études expérimentales sur l'animal selon des protocoles standardisés. Les premiers tests standardisés ont été proposés par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1966 suite aux malformations congénitales initiées par la thalidomide. Ces premiers tests avaient pour but d'identifier les propriétés tératogènes des composés testés. Depuis, plusieurs organismes internationaux ont développé des tests standardisés (EPA, ICH, FDA, OCDE).

L'ICH (*International Conference for Harmonization*) et la FDA (*Food and Drug Administration*) établissent des protocoles pour évaluer les propriétés toxicologiques des médicaments. La FDA élabore également des tests pour les additifs et les colorants alimentaires.

L'EPA (*US Environmental Protection Agency*), l'EPA-OPPTS (*Office of Prevention, Pesticides and Toxic Guidelines*) et l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) s'intéressent aux produits chimiques. De plus en plus, une harmonisation est en cours entre l'OCDE et l'EPA.

Un certain nombre d'auteurs ont tenté de valider les résultats expérimentaux obtenus chez l'animal par rapport aux données humaines, principalement avant les années 1980. Aucun n'a pu le faire de manière complète, cependant il est admis qu'un effet positif dans une étude *in vivo* de toxicité du développement est révélateur d'un effet possible chez l'humain (OCDE, 2008). La prédictivité exacte ne peut se faire qu'à partir d'un faisceau de résultats convergents à partir de diverses études, des différences entre espèces pouvant néanmoins persister.

Les lignes directrices de l'OCDE étant retenues par la réglementation européenne sur les produits chimiques, seules ces dernières méthodes seront présentées.

Méthodes OCDE

Les méthodes OCDE sont au nombre de 6 (plus une 7e dont la validation est en cours) en ce qui concerne l'impact des produits chimiques sur la reproduction (tableau I).

33. Texte extrait de : INRS (dir. Lafon D.). Grossesse et travail. Quels sont les risques pour l'enfant à naître ? EDP Sciences, Collection Avis d'Expert, 2010 : 562 p

Le but de ces tests est de détecter un éventuel effet sur la reproduction. Pour cela, il est nécessaire d'étudier la toxicité de la substance à tous les stades du développement : de la conception à la maturation sexuelle.

On distingue donc plusieurs stades :
- avant accouplement jusqu'à la conception : fonction de reproduction chez le mâle et la femelle adulte, développement et maturation des gamètes, accouplement, fertilité ;
- conception jusqu'à l'implantation : fonctions de reproduction de la femelle adulte, développement pré-implantatoire, implantation ;
- implantation jusqu'à fermeture du palais : fonctions de reproduction de la femelle adulte, développement embryonnaire, formation des organes ;
- fermeture du palais jusqu'au terme de la grossesse : fonctions de reproduction de la femelle adulte, développement et croissance du fœtus, développement et croissance des organes ;
- naissance jusqu'au sevrage : fonctions de reproduction de la femelle adulte, adaptation des nouveau-nés à la vie extra-utérine, développement et croissance des nouveau-nés ;
- sevrage jusqu'à maturité sexuelle : développement et croissance après sevrage, adaptation à la vie indépendante, maturité sexuelle.

Tableau I : Lignes directrices OCDE pour l'étude de la toxicité de la reproduction

Ligne directrice 414	Étude de toxicité pour le développement prénatal
Ligne directrice 415	Étude de toxicité pour la reproduction sur une génération
Ligne directrice 416	Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations
Ligne directrice 421	Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement
Ligne directrice 422	Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement
Ligne directrice 426	Étude de neurotoxicité pour le développement

Le lecteur pourra retrouver une description de ces différentes méthodes en annexe 3.

Il existe également des méthodes OCDE pour évaluer les risques des produits chimiques vis-à-vis des effets de perturbation endocrinienne. Quatre sont validées :
- Ligne directrice 407 : Toxicité orale pendant 28 jours sur les rongeurs (nouvelle méthode révisée qui inclut entre autres une évaluation de certains effets endocriniens) ;
- Ligne directrice 440 : Bio-essai utérotrophique chez les rongeurs : essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques ;
- Ligne directrice 441 : Bio-essai de Hershberger chez le rat : essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques ;

• Ligne directrice 455 : Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur d'œstrogène alpha humain hERα transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste des substances testées.

Ces lignes directrices ne seront pas décrites dans ce document.

Stratégie d'utilisation des tests

Diverses stratégies

Un certain nombre de stratégies d'utilisation de ces tests ont été proposées par diverses instances. Aux États-Unis, l'EPA a publié un guide pour l'évaluation des risques des substances vis-à-vis de la reprotoxicité (EPA, 1991). L'Union européenne a également publié un document (ECB, 2003). Il a été récemment remplacé par un nouveau texte dans le cadre de REACH (ECHA, 2008). L'OCDE propose de même un document de synthèse sur l'évaluation du risque toxique sur la reproduction (OCDE, 2008).

Du fait de ces implications réglementaires, seule la stratégie proposée par l'Union européenne sera présentée.

Stratégie de l'Union européenne

Objectif

L'objectif poursuivi par l'Union européenne est d'évaluer la toxicité sur la reproduction d'une substance chimique en couvrant tous les stades de la reproduction que ce soit la fonction et la capacité de reproduction chez l'homme et la femme, l'induction d'effets non héréditaires dans la descendance, tels que la mort, les retards de croissance, les effets structuraux ou fonctionnels.

Dans le document guide européen (ECB, 2003), les objectifs généraux des tests de toxicité sur la reproduction étaient d'établir :
• si une exposition humaine à une substance donnée avait été associée à des effets néfastes sur les fonctions ou les capacités de reproduction ;
• si dans des études animales, l'administration d'une substance à des mâles ou des femelles avant la conception et durant la grossesse ou la lactation entraîne des effets néfastes sur la fonction ou la capacité de reproduction ;
• si l'administration d'une substance chez l'animal avant ou après la naissance entraîne des effets néfastes non héréditaires sur la progéniture ;
• si la femelle gravide est potentiellement plus sensible à une toxicité générale ;
• s'il existe des relations doses-réponses pour tout type d'effets néfastes sur la reproduction.

Dans le cadre du règlement REACH, les objectifs ont été modifiés ; les alinéas 1, 4 et 5 sont globalement les mêmes, par contre les 2 et 3 sont remplacés par le suivant : « si sur la base d'informations autres que les données humaines, il peut être prédit que la substance entraînera une toxicité sur la reproduction chez l'être humain. ».

Cette phrase permet d'ouvrir les sources d'information à d'autres données que celles issues des études expérimentales sur l'animal. Dans tous les cas, l'objectif est bien de vérifier si des effets néfastes sont anticipés.

À noter que les substances mutagènes sur les cellules germinales (catégories 1 et 2) et cancérogènes génotoxiques (catégorie 3 mutagène et catégories 1 et 2 cancérogènes) ne sont généralement pas testées vis-à-vis de la reproduction. Elles sont considérées d'emblée comme potentiellement toxiques pour la reproduction. Une substance génotoxique sur les cellules germinales est en effet susceptible d'entraîner avortements, malformations et maladies héréditaires. De plus, on ne peut exclure qu'une substance génotoxique sur cellules somatiques puisse engendrer des cancers.

Données minimales requises

Afin de pouvoir correctement évaluer les propriétés dangereuses d'une substance, le TGD (*Technical Guidance Document*) préconisait de disposer au minimum de trois études :

- une étude sur deux générations (EU annexe V B 35 ou OCDE 416) ;
- une étude de toxicité sur le développement prénatal (tératogénicité) sur 2 espèces (EU annexe V B 31 ou OCDE 414).

Cette position était présentée dans la réglementation antérieure à REACH. Dans REACH, cette position n'apparaît plus clairement.

Dans la réglementation antérieure, il était cependant précisé que ces études pouvaient être réduites si l'on disposait de données le justifiant.

Les études pouvant être utilisées pour évaluer le potentiel toxique d'une substance sont listées dans les guides concernant la réglementation avant REACH (que nous appellerons ancienne réglementation) puis REACH (que nous appellerons nouvelle réglementation) ; dans la nouvelle réglementation apparaissent les SAR et les modèles R(Q)SA (relations structures activités quantitatives).

Évaluation d'une dose seuil

La toxicité pour la reproduction est généralement considérée comme un effet avec un effet seuil. Il est donc important de déterminer si possible une NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*), voire une LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) et de pouvoir calculer une *Benchmark dose* ou non.

Principes généraux

Le TGD proposait la démarche par étape suivante :

- commencer par collecter toute information sur les caractéristiques physico-chimiques de la substance, sa toxicocinétique et les informations sur des substances équivalentes (relations structure-activité) ;
- choisir les espèces animales à utiliser. En règle générale, le rat est l'espèce de premier choix pour les études sur deux générations. Les études sur la toxicité sur le développement sont généralement conduites sur le rat et le lapin du fait de l'importance des données disponibles sur ces deux espèces. On ne doit utiliser d'autres espèces que si des informations claires sur leur meilleure indication sont disponibles ;
- choisir la voie d'exposition en fonction des conditions d'exposition humaine, des caractéristiques physico-chimiques de la substance, de sa toxicité et des contraintes techniques du test. Idéalement, les données de toxicocinétique et de métabolisme devraient guider ce choix. En règle générale, la voie orale est largement utilisée sauf s'il est démontré qu'elle est inappropriée. Il est recommandé de ne pas utiliser la voie intrapéritonéale ni des voies parentérales. La voie dermique peut entraîner des effets de stress.

Le principe de base de cette stratégie est de fonctionner étape par étape en attendant les résultats de la première étude avant de commencer la seconde.

Il est recommandé que le premier des tests de reproduction effectué soit le test sur deux générations. Ce test devrait démarrer après une étude sub-chronique 90 jours afin de déterminer les doses à utiliser, et éventuellement orienter vers certains types de toxicité à étudier plus précisément ou des effets spécifiques comme la neurotoxicité. L'étude sur la toxicité du développement intervient ensuite et doit tenir compte des relations dose-réponse et de la toxicité maternelle. Il est préférable de commencer par le rat, espèce déjà utilisée dans l'étude sur deux générations. L'utilité de la deuxième étude sur le lapin est fonction des résultats de la première étude chez le rat.

REACH propose également un fonctionnement par étape. Dans l'étape 1, deux questions doivent être posées :

- la substance est-elle déjà classée toxique pour la reproduction (fertilité et développement : catégorie 1 ou 2 R60 et catégorie 1 ou 2 R61), ou mutagène catégorie 1, 2 ou 3, ou cancérogène catégorie 1 ou 2 (mais avec en sus une classification mutagène catégorie 3) ?
- la substance est-elle peu toxique, son absorption systémique est-elle négligeable et l'exposition humaine nulle ou non significative ?

Si la réponse est positive à une de ces questions, aucun test spécifique pour la reproduction n'est généralement exigé.

L'étape 2 s'applique à partir d'un tonnage mis sur le marché supérieur à 10 tonnes par an : recueillir l'ensemble des données toxicologiques disponibles afin de décider si la substance ne présente pas de danger pour la reproduction ou que des données supplémentaires ne permettraient pas de

changer une classification catégorie 3. Si les données sont insuffisantes ou s'il existe des signaux d'alerte, les questions suivantes vont se poser :

- Y a-t-il des signaux d'alerte de toxicité pour la reproduction ?
- Les données sont-elles suffisantes et adéquates pour évaluer la classification, l'étiquetage et le risque ou des tests complémentaires sont-ils nécessaires ?
- Si non, quels tests supplémentaires sont nécessaires ?

L'étape 3 consistera à réaliser les tests spécifiques chez l'animal pour répondre à ces questions.

Les 4 tests qui permettent de faire une évaluation robuste sont : OCDE 421 ou 422 ; OCDE 414 ; OCDE 416.

Il n'est cependant pas toujours nécessaire de réaliser les 4. Les tests demandés sont fonction du tonnage tel que retranscrit dans le tableau II.

Niveau de dose

La dose maximale administrée ne doit pas excéder 1 000 mg/kg/j. Elle doit entraîner si possible une légère toxicité chez les parents, notamment une légère perte de poids mais ne pas entraîner plus de 10 % de mort maternelle (il est recommandé qu'il n'y ait pas de mort maternelle). Les doses les plus faibles doivent être choisies avec l'objectif de pouvoir établir une relation dose-réponse et un niveau sans effet.

Claire Beausoleil

Anses[34], *Unité Toxicologie / Direction Santé Environnement Travail*

34. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Tableau II : Obligations de tests vis-à-vis de la reproduction selon REACH et l'ancienne réglementation sur les substances nouvelles

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
<1 tonne	Aucun		Procédure d'autorisation ou de restriction possible si substance connue comme étant CMR catégorie 1 ou 2, PBT (Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques) ou vPvB (Très persistantes, très bioaccumulables)	Pas d'enregistrement	Aucun
⩾1 tonne	Aucun		Cette annexe ne s'applique pas aux substances mises sur le marché entre 1 et 10 tonnes par an et ayant déjà été mises sur le marché (en quelque quantité que ce soit) avant 1981 (soit 100 204 substances), et possédant un numéro EINECS ou mises sur le marché après 1981 et retirées depuis le 1er juin 1992. Elle ne s'applique pas non plus aux substances pour lesquelles sur la base de modèles RQ(S)A ou par d'autres moyens une classification CMR catégorie 1 ou 2, PBT ou vPvB ne peut être anticipée. Pour ces substances, il y a uniquement obligation de fournir toute autre information disponible pertinente d'ordre toxicologique, écotoxicologique et physico-chimique. Elle s'appliquerait donc, pour les substances chimiques, uniquement aux substances mises sur le marché depuis 1981 (soit 4 381 substances) (sauf si retirée du marché depuis le 1er juin 1992) avec un tonnage supérieur à 10 tonnes et aux substances nouvellement mises sur le marché avec un tonnage compris entre 1 et 10 tonnes par an et non considérées comme notifiées conformément à l'article 8, paragraphe 1, premier tiret, de la directive 67/548/CEE.	1er juin 2018	Évaluation de la reprotoxicité sur des critères particuliers

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
⩾10 tonnes	En cas d'absence de signal d'alerte (sur la base d'analogie de structure, d'estimations R(Q)SA ou de méthodes *in vitro*), faire un test de dépistage (OCDE 421 ou 422).	- Cancérogène génotoxique et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Mutagène sur cellules germinales et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Si une exposition humaine peut être exclue - Étude de toxicité disponible au stade du développement prénatal ou pour la reproduction sur deux générations	Dans les cas où les effets nocifs potentiels sur la fertilité ou le développement suscitent de sérieuses préoccupations, le déclarant peut proposer de remplacer l'étude de dépistage par une étude de toxicité sur le développement prénatal ou une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations. Si une substance est connue pour avoir des effets néfastes sur la fertilité, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R60, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de fertilité. Il faut, toutefois, envisager des essais portant sur la toxicité au stade du développement. Si une substance est connue pour être à l'origine d'une toxicité sur le développement, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R61, et que les données disponibles conviennent à une solide évaluation des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de toxicité au stade du développement. Il faudra toutefois envisager des essais concernant les effets sur la fertilité.	1er juin 2018	Si les risques de la substance le justifient

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
⩾100 tonnes	Étude de toxicité sur le développement prénatal, une espèce, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, si l'étude de 28 jours ou de 90 jours fait apparaître des effets nocifs sur les organes ou les tissus reproductifs.	- Cancérogène génotoxique et mesures appropriées de gestion des risques sont mises en œuvre - Mutagène sur cellules germinales et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Si la substance a une faible activité toxicologique (si aucun des tests disponibles n'a fourni de preuves de toxicité), si des données toxicocinétiques permettent de prouver qu'aucune absorption systémique ne se produit par les voies d'exposition prises en considération (par exemple : concentrations plasma/sang inférieures à la limite de détection en cas d'utilisation d'une méthode sensible, et absence de la substance et de métabolites de la substance dans l'urine, la bile ou l'air exhalé), et s'il n'y a pas d'exposition humaine ou pas d'exposition humaine importante.	L'étude est effectuée initialement sur une espèce. En fonction du résultat du premier essai et de toutes les autres données pertinentes disponibles, il peut être décidé d'effectuer une étude sur une deuxième espèce à ce niveau de quantité ou au suivant.	1er juin 2013	- Étude de tératogenèse : 1 espèce. En cas de résultats douteux, une étude sur deux générations est nécessaire. - Étude de fertilité : 1 espèce, 1 génération

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
⩾1 000 tonnes	Étude de toxicité au stade du développement, une espèce, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine (OCDE 414) Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, sauf si ces données sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe IX.	- Cancérogène génotoxique et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Mutagène sur cellules germinales et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Si la substance a une faible activité toxicologique (si aucun des tests disponibles n'a fourni de preuves de toxicité), si des données toxicocinétiques permettent de prouver qu'aucune absorption systémique ne se produit par les voies d'exposition prises en considération (par exemple : concentrations plasma/sang inférieures à la limite de détection en cas d'utilisation d'une méthode sensible, et absence de la substance et de métabolites de la substance dans l'urine, la bile ou l'air exhalé), et s'il n'y a pas d'exposition humaine ou pas d'exposition humaine importante.	Si une substance est connue pour avoir des effets néfastes sur la fertilité, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R60, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de fertilité. Il faudra toutefois envisager des essais portant sur la toxicité sur le développement. Si une substance est connue pour être à l'origine de toxicité sur le développement, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R61, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de toxicité sur le développement. Il faudra, toutefois, envisager des essais concernant les effets sur la fertilité.	1er décembre 2010	- Étude de toxicité liée au développement concernant les effets péri-et postnataux - Étude de tératogenèse (autre espèce) - Étude de fertilité (étude sur 2 générations) : seulement si un effet sur la fertilité a été constaté précédemment.

Bibliographie

ECB (EUROPEAN CHEMICALS BUREAU). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances. Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances. Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part 1. EUR 20418 EN/1. Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities. 2003, 311p

ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7a. Endpoint specific guidance. Guidance for the implementation of REACH. Helsinki. 2008, 428p

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Environmental Protection Agency Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. EPA/600/FR-91/001. Washington DC. 1991, 83p

OECD (ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES). Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. OECD Environment, Health and safety Publications. Series on Testing and Assessment N° 43. Paris. 2008, 88p

Annexes

ANNEXE 1

Expertise collective Inserm : Éléments de méthode

L'Expertise collective Inserm[30] apporte un éclairage scientifique sur un sujet donné dans le domaine de la santé à partir de l'analyse critique et de la synthèse de la littérature scientifique internationale. Elle est réalisée à la demande d'institutions souhaitant disposer des données récentes issues de la recherche utiles à leurs processus décisionnels en matière de politique publique. L'Expertise collective Inserm doit être considérée comme une étape initiale, nécessaire mais le plus souvent non suffisante, pour aboutir aux prises de décision. Les conclusions apportées par les travaux d'expertise collective contribuent, mais ne peuvent se substituer, au débat des professionnels concernés ou au débat de société si les questions traitées sont particulièrement complexes et sensibles.

L'Expertise collective Inserm peut être complétée, à la demande d'un commanditaire, par une expertise « opérationnelle » qui s'intéresse à l'application des connaissances et recommandations en tenant compte de facteurs contextuels (programmes existants, structures, acteurs, formations...). Ce type d'expertise sollicite la participation d'acteurs de terrain susceptibles de répondre aux aspects de faisabilité, de représentants d'administrations ou institutions chargées de promouvoir les applications dans le domaine concerné, d'experts ayant participé aux expertises, de représentants d'associations de patients. La mise en commun de cultures et d'expériences variées permet une approche complémentaire à l'expertise collective dans un objectif d'opérationnalité. De même, différents travaux (recommandations de bonnes pratiques, audition publique...) conduits sous l'égide de la Haute autorité de santé (HAS) peuvent faire suite à une expertise collective Inserm.

L'expertise collective est une mission de l'Inserm depuis 1994. Une soixantaine d'expertises collectives ont été réalisées dans de nombreux domaines de la santé. L'Institut est garant des conditions dans lesquelles l'expertise est réalisée (exhaustivité des sources documentaires, qualification et indépendance des experts, transparence du processus).

Le Centre d'expertise collective Inserm organise les différentes étapes de l'expertise depuis la phase d'instruction jusqu'aux aspects de communication du rapport avec le concours des services de l'Inserm. L'équipe du Centre d'expertise collective constituée d'ingénieurs, de chercheurs et d'un secrétariat assure la recherche documentaire, la logistique et l'animation des réunions d'expertise, et contribue à la rédaction scientifique et à l'élaboration des

30. Label déposé par l'Inserm

produits de l'expertise. Des échanges réguliers avec d'autres organismes publics (EPST) pratiquant le même type d'expertise collective ont permis de mettre en place des procédures similaires.

Instruction de la demande

La phase d'instruction permet de définir la demande avec le commanditaire, de vérifier qu'il existe bien une littérature scientifique accessible sur la question posée et d'établir un cahier des charges qui précise le cadrage de l'expertise (état des lieux du périmètre et des principales thématiques du sujet), sa durée et son budget à travers une convention signée entre le commanditaire et l'Inserm.

Au cours de cette phase d'instruction sont également organisées par l'Inserm des rencontres avec les associations de patients pour prendre connaissance des questions qu'elles souhaitent voir traitées et des sources de données dont elles disposent. Ces informations seront intégrées au programme scientifique de l'expertise. Pour certains sujets, un échange avec des partenaires industriels s'avère indispensable pour avoir accès à des données complémentaires inaccessibles dans les bases de données.

Mise en place d'un comité de suivi et d'une cellule d'accompagnement de l'expertise

Un comité de suivi constitué de représentants du commanditaire et de l'Inserm est mis en place. Il se réunit plusieurs fois au cours de l'expertise pour suivre la progression du travail des experts, évoquer les difficultés éventuelles rencontrées dans le traitement des questions, veiller au respect du cahier des charges et examiner d'éventuels nouveaux éléments du contexte réglementaire et politique utiles pour le travail en cours. Le comité est également réuni en fin d'expertise pour la présentation des conclusions de l'expertise avant l'établissement de la version finale du rapport.

Pour les expertises traitant de sujets sensibles, une cellule d'accompagnement est également mise en place qui réunit des représentants de la Direction générale de l'Inserm, du conseil scientifique, du comité d'éthique de l'Inserm, du département de la communication, des chercheurs en sciences humaines et sociales et des spécialistes d'histoire des sciences. Cette cellule a pour rôle de repérer au début de l'expertise les problématiques susceptibles d'avoir une forte résonance pour les professionnels concernés et pour la société civile et de suggérer l'audition de professionnels des domaines connexes, de représentants de la société civile et d'associations de patients. En bref, il s'agit de prendre la mesure de la perception que les différents destinataires pourront avoir de l'expertise. Avant la publication de l'expertise, la cellule d'accompagnement porte une attention particulière à la façon dont la synthèse et les

recommandations sont rédigées incluant si nécessaire l'expression de différents points de vue. En aval de l'expertise, la cellule a pour mission de renforcer et d'améliorer la diffusion des résultats de l'expertise en organisant par exemple des colloques ou séminaires avec les professionnels du domaine et les acteurs concernés ou encore des débats publics avec les représentants de la société civile. Ces échanges doivent permettre une meilleure compréhension et une appropriation de la connaissance issue de l'expertise.

Réalisation de la recherche bibliographique

Le cahier des charges, établi avec le commanditaire, est traduit en une liste exhaustive de questions scientifiques correspondant au périmètre de l'expertise avec l'aide de scientifiques référents du domaine appartenant aux instances de l'Inserm. Les questions scientifiques permettent d'identifier les disciplines concernées et de construire une arborescence de mots clés qui servira à une interrogation systématique des bases de données biomédicales internationales. Les articles et documents sélectionnés en fonction de leur pertinence pour répondre aux questions scientifiques constituent la base documentaire qui sera transmise aux experts. Il sera demandé à chacun des membres du groupe de compléter tout au long de l'expertise cette base documentaire.

Des rapports institutionnels (parlementaires, européens, internationaux...), des données statistiques brutes, des publications émanant d'associations et d'autres documents de littérature grise sont également repérés (sans prétention à l'exhaustivité) pour compléter les publications académiques et mis à la disposition des experts. Il leur revient de prendre en compte, ou non, ces sources selon l'intérêt et la qualité des informations qu'ils leur reconnaissent. Enfin, une revue des principaux articles de la presse française est fournie aux experts au cours de l'expertise leur permettant de suivre l'actualité sur le thème et sa traduction sociale.

Constitution du groupe d'experts

Le groupe d'experts est constitué en fonction des compétences scientifiques nécessaires à l'analyse de l'ensemble de la bibliographie recueillie et à la complémentarité des approches. L'Expertise collective Inserm étant définie comme une analyse critique des connaissances académiques disponibles, le choix des experts se fonde sur leurs compétences scientifiques, attestées par leurs publications dans des revues à comité de lecture et la reconnaissance par leurs pairs. La logique de recrutement des experts fondée sur leur compétence scientifique et non leur connaissance du terrain est à souligner, dans la mesure où il s'agit d'une source récurrente de malentendus lors de la publication des expertises.

Les experts sont choisis dans l'ensemble de la communauté scientifique française et internationale. Ils doivent être indépendants du partenaire commanditaire de l'expertise et de groupes de pression reconnus. La composition du groupe d'experts est validée par la Direction générale de l'Inserm.

Plusieurs scientifiques extérieurs au groupe peuvent être sollicités pour apporter ponctuellement leur contribution sur un thème particulier au cours de l'expertise.

Le travail des experts dure de 12 à 18 mois selon le volume de littérature à analyser et la complexité du sujet.

Première réunion du groupe d'experts

Avant la première réunion, les experts reçoivent un document explicatif de leur mission, le programme scientifique (les questions à traiter), le plan de travail, la base bibliographique de l'expertise établie à ce jour ainsi que les articles qui leur sont plus spécifiquement attribués selon leur champ de compétence.

Au cours de la première réunion, le groupe d'experts discute la liste des questions à traiter, la complète ou la modifie. Il examine également la base bibliographique et propose des recherches supplémentaires pour l'enrichir.

Analyse critique de la littérature par les experts

Au cours des réunions, chaque expert est amené à présenter oralement son analyse critique de la littérature sur l'aspect qui lui a été attribué dans son champ de compétence en faisant la part des acquis, incertitudes et controverses du savoir actuel. Les questions, remarques, points de convergence ou de divergence suscités par cette analyse au sein du groupe sont pris en considération dans le chapitre que chacun des experts rédige. Le rapport d'analyse, regroupant ces différents chapitres, reflète ainsi l'état de l'art dans les différentes disciplines concernées par le sujet traité. Les références bibliographiques utilisées par l'expert sont citées au sein et en fin de chapitre.

Synthèse et recommandations

Une synthèse reprend les grandes lignes de l'analyse de la littérature et en dégage les principaux constats et lignes de force. Certaines contributions d'intervenants extérieurs au groupe peuvent être résumées dans la synthèse.

Cette synthèse est plus spécifiquement destinée au commanditaire et aux décideurs dans une perspective d'utilisation des connaissances qui y sont présentées. Son écriture doit donc tenir compte du fait qu'elle sera lue par des non scientifiques.

Dès la publication du rapport, cette synthèse est mise en ligne sur le site Web de l'Inserm. Elle fait l'objet d'une traduction en anglais qui est accessible sur le site du NCBI/NLM (*National Center for Biotechnology Information* de la *National Library of Medecine*) et Sinapse (*Scientific INformAtion for Policy Support in Europe*, site de la Commission Européenne).

À la demande du commanditaire, certaines expertises collectives s'accompagnent de « recommandations ». Deux types de « recommandations » sont formulés par le groupe d'experts. Des « principes d'actions » qui s'appuient sur un référentiel scientifique validé pour définir des actions futures en santé publique (essentiellement en dépistage, prévention et prise en charge) mais qui en aucun cas ne peuvent être considérés comme des recommandations « opérationnelles » dans la mesure où les éléments du contexte économique ou politique n'ont pas été pris en compte dans l'analyse scientifique. Des « axes de recherche » sont également proposés par le groupe d'experts pour combler les lacunes de connaissances scientifiques constatées au cours de l'analyse. Là encore, ces propositions ne peuvent être considérées comme des recherches « prioritaires » sans une mise en perspective qu'il revient aux instances concernées de réaliser.

Lecture critique du rapport et de la synthèse par des grands « lecteurs »

Pour certaines expertises traitant de sujets sensibles, une note de lecture critique est demandée à plusieurs grands « lecteurs » choisis pour leurs compétences scientifiques ou médicales, exerçant des fonctions d'animation ou d'évaluation dans des programmes de recherche français ou européens ou encore participant à des groupes de travail ministériels. De même, le rapport et la synthèse (et recommandations) peuvent être soumis à des personnalités ayant une bonne connaissance du « terrain » et susceptibles d'appréhender les enjeux socioéconomiques et politiques des connaissances (et propositions) qui sont présentées dans l'expertise.

Présentation des conclusions de l'expertise et mise en débat

Un séminaire ouvert à différents milieux concernés par le thème de l'expertise (associations de patients, associations professionnelles, syndicats, institutions...) permet une première mise en débat des conclusions de l'expertise. C'est à partir de cet échange que peut être établie la version finale du document de synthèse intégrant les différents points de vue qui se sont exprimés.

Tableau : Récapitulatif des principales données

	BPA	Phtalates	Polybromés	Composés perfluorés (PFOS, PFOA)	Parabènes
Usages (quelques exemples)	Polycarbonate et résines époxy Emballages alimentaires, composites dentaires...	Agent plastifiant, construction, peintures, cosmétiques, emballage alimentaire, matériels médicaux...)	Retardateurs de flamme (ignifugeant des matières plastiques et textiles, composants électroniques et matériels électriques...)	Antiadhésifs et anti-tache (textiles, matériaux de cuisson...)	Conservateurs (cosmétiques, additifs alimentaires, médicaments)
Voie principale d'exposition	Alimentation	Alimentation ; Contact percutané (enfants)	Alimentation (composés rémanents) ; Contact direct (enfants)	Alimentation (composés rémanents) ; Contact direct (enfants)	Contact percutané ; Alimentation
DJT (µg/kg/j) Efsa	50	DEHP : 50 ; DBP : 10 ; BBP : 500	En cours	PFOS : 0,15 ; PFOA : 1,5	0-10 000 (éthyl +méthyl)
Exposition moyenne (µg/kg/j)	Adulte : 0,1 Enfant : 1	DEHP Adulte : 2 Enfant <6 mois : 10 Enfant >6 mois : 20	PBDE : 0,001	0,005	1 300 (estimation)
Demi-vie	4-8 h (homme adulte)	DEHP : 18 h	Quelques semaines (BDE 209) à quelques années (BDE 47)	Quelques années	Quelques heures
Effets/animaux Mâles	Hypotrophie testiculaire, hypertrophie prostatique, distance anogénitale plus courte, anomalies spermatiques, anomalies des taux hormonaux	Distance anogénitale plus courte, hypospadias, cryptorchidie, rétention aréoles mammaires, anomalies spermatiques, perturbations taux hormonaux	Distance anogénitale plus courte, anomalies spermatiques, perturbation taux hormonaux	PFDoA : diminution taux testostérone	Propyl parabène : altérations paramètres spermatiques (discuté) Butyl parabène : diminution testostérone (discuté)

	BPA	Phtalates	Polybromés	Composés perfluorés (PFOS, PFOA)	Parabènes
Effets/animaux Femelles	Anomalies utérus, vagin ovaire, endomètre ; puberté précoce, anomalies taux hormonaux (cyclicité, fonction ovarienne), perturbation comportement	Puberté (avancée ou retardée), perturbation taux hormonaux (cycles irréguliers)	Diminution des follicules ovariens, anomalies taux hormonaux	PFOS/PFOA : perturbation taux hormonaux, retard maturité sexuelle, effets sur cycles œstriens	Méthyl isopropyl parabène : effet sur puberté Butyl, isobutyl parabène : hypertrophie du myomètre
Principaux organes cibles chez le mâle	Prostate (développement), testicule	Testicule fœtal	Testicule	Testicule	-
Principaux organes cibles chez la femelle	Hypothalamus, hypophyse, ovaire, utérus, tissu mammaire	Ovaire, utérus	Ovaire, utérus	Ovaire, tissu mammaire	Ovaire, utérus
Périodes critiques chez l'animal	*In utero*, période néonatale	*In utero*, période néonatale	*In utero*, période néonatale	*In utero*, période néonatale	Prépubaire et adulte
Effets sur la fonction de reproduction chez l'homme	Effet possible sur la fonction sexuelle, les caractéristiques spermatiques, les taux d'hormone chez l'homme adulte	Effet possible sur la distance anogénitale, hypospadias, cryptorchidie (exposition *in utero*) Effet possible sur les caractéristiques spermatiques et taux hormonaux (exposition adulte)	PBDE : effet possible sur cryptorchidie et perturbation taux hormonaux (exposition *in utero*)	Effet possible sur la morphologie des spermatozoïdes (exposition adulte)	Pas d'effet mis en évidence
Effets sur la fonction de reproduction chez la femme	Pas d'étude de qualité suffisante	Effet possible sur puberté précoce (exposition enfance)	Effet possible sur augmentation du délai pour concevoir (exposition adulte)	Effet possible sur augmentation d'infécondité involontaire	Pas d'effet mis en évidence
Voie hormonale perturbée	Altération de la sensibilité aux œstrogènes	Effet anti-androgénique, effet œstrogénique	Altération de la sensibilité aux œstrogènes et hormones thyroïdiennes	Altération de la sensibilité aux œstrogènes	Altération de la sensibilité aux œstrogènes
Points importants	Effets transgénérationnels, effets faibles doses, effet non monotone, liaison à de nombreux récepteurs, effets révélés à long terme	Effets additifs possibles, peu d'études sur femelle, variabilité inter-espèces selon composés et fenêtre d'exposition	Pas assez d'études sur les mélanges autorisés PBDE, sur HBCD TBBPA ; liaison à de nombreux récepteurs	Pas assez d'études aux doses compatibles avec exposition	Très peu d'études

DJT : Dose journalière tolérable ; EFSA : *European Food Safety Authority*

ANNEXE 3

Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques

OCDE 414 : Étude de toxicité pour le développement pré-natal

But : L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés toxiques vis-à-vis du développement pré-natal de la substance testée, c'est-à-dire les effets sur la mère, les pertes pré- ou post-implantatoires, la mortalité fœtale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus.

Animaux d'expérience : Il est demandé au moins deux espèces (rongeurs et non rongeurs), généralement le rat et le lapin. Il est conseillé d'utiliser un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir autopsier environ 20 femelles présentant un point d'implantation.

Programmes expérimentaux : La substance testée est administrée aux femelles gravides, pendant la période d'organogenèse : de l'implantation jusqu'à la veille du sacrifice.

La mère est sacrifiée environ 1 jour avant la parturition. Les fœtus sont extraits par césarienne pour éviter une sélection naturelle de la mère (élimination des nouveau-nés malformés ou morts nés).

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :
– pendant l'étude :
• signes de toxicité, mortalité ;
• poids corporel ;
• consommation de nourriture.
– examen terminal de la mère :
• autopsie ;
• évaluation macroscopique de tous les organes ;
• examen de l'utérus : poids de l'utérus gravide, nombre de corps jaunes, sites d'implantations, résorptions ;
• examen du placenta.
– examen terminal des fœtus :
• nombre de fœtus vivants et morts ;
• sexe des fœtus ;
• poids des fœtus ;

- malformations, anomalies du squelette et des tissus mous.

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués d'après les effets observés chez les fœtus et les mères et en fonction de l'incidence et de la sévérité des effets, d'une relation dose-réponse, des doses auxquelles on observe des effets et doivent permettre de déterminer une dose sans effet toxique pour le développement et pour les mères.

OCDE 415 : Étude de toxicité de la reproduction sur une génération

But : L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets d'une substance testée sur les performances de reproduction des mâles et des femelles, telles que la fonction génitale, le cycle œstral, le comportement lors de l'accouplement, la conception, la gestation, la parturition, la lactation et le sevrage.

Animaux d'expérience : Au moins une espèce, généralement le rat. Il est conseillé d'utiliser un nombre suffisant d'animaux afin d'obtenir au moins 20 femelles gravides.

Programmes expérimentaux : Le traitement doit être appliqué en phase de gamétogenèse, avant l'accouplement : 3 semaines pour le rat femelle et 10 semaines pour le rat mâle. Les animaux sont identifiés et accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle) ou 1 : 2 (un mâle pour deux femelles). Le traitement se poursuit pendant l'accouplement, puis jusqu'au sevrage des nouveau-nés pour les femelles. Les mâles sont sacrifiés après l'accouplement et les femelles après le sevrage.

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :
– Pendant l'étude :
- signes de toxicité, mortalité ;
- comportement pendant la gestation ;
- poids corporel ;
- consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation) ;
- durée de gestation ;
- parturition.

– Après la naissance :
- mortalité à la naissance ;
- nombre et sexe des petits ;
- poids à la naissance et à J4, puis chaque semaine jusqu'à la fin de l'étude ;
- développement physique, malformations ou anomalies ;
- fonctions sensorielles et réflexes ;
- survie jusqu'à 1 semaine.

– Examen terminal :
• examen macroscopique des adultes et des nouveau-nés ;
• examens histologiques des organes de la reproduction des adultes (testicules, épididymes, vésicules séminales, prostate, glande coagulante, ovaires, utérus, cervix, vagin, hypophyse) ;
• isolement des autres organes pour examen histologique éventuel.

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués d'après les effets observés et en fonction des doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité) et doivent permettre de déterminer la dose sans effet. Ces études doivent fournir une estimation satisfaisante d'une dose sans effet toxique et permettre d'évaluer les effets nocifs sur la reproduction, la parturition, la lactation et la croissance postnatale des nouveau-nés.

OCDE 416 : Étude de toxicité de la reproduction sur deux générations

But : L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets d'une substance testée sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gravité, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement de la descendance et orienter des essais ultérieurs. Cette ligne directrice étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, ainsi que la croissance et le développement de la génération F2. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels, en complétant le présent protocole d'après les lignes directrices se rapportant à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou, en étudiant ces effets dans le cadre d'autres essais, en utilisant les lignes directrices appropriées.

Animaux d'expérience : Au moins une espèce, généralement le rat. Il est conseillé d'utiliser un nombre suffisant d'animaux afin d'obtenir au moins 20 femelles gravides.

Programmes expérimentaux : La substance d'essai est administrée durant la phase de gamétogenèse avant l'accouplement : durant plusieurs cycles œstraux pour la femelle et un cycle de spermatogenèse complet pour le mâle (70 jours chez le rat ; 56 jours chez la souris). Les animaux sont identifiés et accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle) ou 1 : 2 (un mâle pour deux femelles). Les animaux parents (génération P) continuent à être

traités pendant la période d'accouplement (mâles et femelles), de gravidité et jusqu'au sevrage des nouveau-nés (femelle uniquement). Après le sevrage, les nouveau-nés (génération F1) sont eux aussi traités puis accouplés entre eux (mâle et femelle de portées différentes). La procédure ensuite est identique à celle appliquée aux animaux parents jusqu'à la production d'animaux de la deuxième génération (génération F2).

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :
– pendant l'étude :
• signes de toxicité, mortalité ;
• comportement pendant la gestation ;
• poids corporel ;
• consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation) ;
• durée de gestation ;
• parturition.
– après la naissance :
• mortalité à la naissance ;
• nombre et sexe des nouveau-nés ;
• poids à la naissance et à J4, puis chaque semaine jusqu'à la fin de l'allaitement ;
• développement physique, malformations ou anomalies ;
• activité réflexe, fonctions sensorielles et réflexes ;
• informations relatives à la maturité sexuelle ;
• survie jusqu'à 1 semaine.
– examen terminal :
• examen macroscopique des adultes et des nouveau-nés ;
• pesée des organes de la reproduction des animaux (P et F1) : testicules, épididymes, vésicules séminales, prostate, glande coagulante, ovaires, utérus ;
• pesée des organes suivants : cerveau, foie, rate, hypohyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus chez les animaux (P et F1) ;
• pesée du cerveau, de la rate et du thymus des petits (F1 et F2) destinés à l'autopsie ;
• isolement des autres organes pour examen histologique éventuel ;
• examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents (P et F1) (testicules, épididymes, vésicules séminales, glande coagulante, prostate, ovaires, utérus, cervix, vagin, hypophyse).

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité). Ils permettent de déterminer la dose sans effet. Ainsi on peut évaluer les effets sur la reproduction, la parturition, l'allaitement, la croissance postnatale et la maturation sexuelle des nouveau-nés.

OCDE 421 : Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement

But : L'objectif de cette étude est d'obtenir une première série d'informations sur les effets possibles d'une substance sur les performances de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Cette ligne directrice ne vient pas en remplacement des lignes directrices OCDE 414, 415 et 416 ; elle ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. Des résultats négatifs obtenus avec cette méthode, bien qu'ils ne garantissent pas une entière sécurité pour la reproduction et le développement, peuvent dans une certaine mesure apaiser les craintes si l'exposition effective a été incontestablement inférieure à la concentration maximale sans effet nocif observé (CSENO).

Animaux d'expérience : Cette méthode vise les essais sur le rat. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 animaux de chaque sexe, pour obtenir au moins 8 femelles gestantes/dose.

Programmes expérimentaux : La substance testée est administrée aux mâles et aux femelles et doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement. Cette administration se poursuit pendant la période d'accouplement (14 jours maximum). Les mâles sont traités un minimum de 4 semaines. L'administration aux femelles de la génération parentale continue pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3e jour post-partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. Les animaux sont accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle). Tout au long de l'essai, les animaux sont soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour. Les signes de parturition difficile ou prolongée, les signes de toxicité, mortalité comprise doivent être consignés. Les mâles sont généralement sacrifiés après l'accouplement après un minimum de traitement de 28 jours. Les femelles de la génération parentale ainsi que les nouveau-nés survivants sont sacrifiés au 4e jour post-partum.

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :
– pendant l'étude :
- signes de toxicité, mortalité ;
- poids corporel ;
- consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation ainsi qu'à J0-J1 et à J4 du post-partum) ;
- durée de gestation ;
- parturition ;
- mortalité à la naissance ;
- nombre et sexe des nouveau-nés ;
- poids des portées à J0-1 et à J4 post-partum ;

- développement physique, malformations ou anomalies ;
- fonctions sensorielles et réflexes ;
- survie jusqu'à 1 semaine - comportement pendant la gestation ;

– après sacrifice :

- autopsie générale ;
- pesée des organes de la reproduction des mâles (P) : testicules, épididymes ;
- examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents ayant reçu les doses les plus élevées (testicules, épidymes, ovaires) ;
- examen macroscopique des nouveau-nés ou des petits morts (anomalies) ;
- nombre de sites d'implantation et de corps jaunes.

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles (anomalies, action sur la reproduction, fertilité, modification du poids corporel, organes cibles, atteintes histologiques, mortalité), et doivent permettre de déterminer une dose sans effet. Ces données contribuent à l'évaluation des effets sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et le développement postnatal des nouveau-nés.

OCDE 422 : Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement

But : L'objectif de cette étude est d'obtenir des informations initiales relatives aux dangers possibles pour la santé découlant d'expositions répétées pendant une période relativement limitée incluant la neurotoxicité et l'immunotoxicité. Cette méthode d'essai permet également de fournir des informations initiales sur les effets possibles sur la reproduction et le développement : tels que la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Cette ligne directrice ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement et ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. Des résultats négatifs obtenus avec cette méthode, bien qu'ils ne garantissent pas une entière sécurité pour la reproduction et le développement, peuvent dans une certaine mesure apaiser les craintes si l'exposition effective a été incontestablement inférieure à la concentration maximale sans effet nocif observé (CSENO).

Animaux d'expérience : Cette méthode vise les essais sur le rat. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 animaux de chaque sexe, pour obtenir au moins 8 femelles gestantes/dose.

Programmes expérimentaux : La substance testée est administrée aux mâles et aux femelles et doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement. Cette administration se poursuit pendant la période d'accouplement (14 jours maximum). Les mâles sont traités un minimum de 4 semaines. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou, le cas échéant, maintenus en vie et restent

soumis à l'administration de doses en vue d'un second accouplement, si on le juge approprié. Lorsque la substance est administrée par voie orale, le traitement des femelles de la génération parentale se poursuit pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3e jour post-partum inclus ou juqu'au jour précédant le sacrifice. Les animaux sont accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle). Tout au long de l'essai, les animaux sont soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour. Les signes de parturition difficile ou prolongée, les signes de toxicité, mortalité comprise, doivent être consignés. Les mâles sont généralement sacrifiés après l'accouplement après un minimum de traitement de 28 jours. Les femelles de la génération parentale ainsi que les nouveau-nés survivants sont sacrifiés au 4e jour post-partum.

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :

– pendant l'étude :
- signes de toxicité, mortalité ;
- examen clinique minutieux (comportements, démarches, stéréotypes, activités réflexes...) ;
- évaluation de la réactivité sensorielle à des stimuli auditif, visuel et proprioceptif, la force d'agrippement et l'activité motrice... ;
- hématologie et biochimie clinique ;
- poids corporel ;
- consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation ainsi qu'à J0-J1 et à J4 du post-partum) ;
- durée de gestation ;
- comportement pendant la gestation ;
- parturition ;
- mortalité à la naissance ;
- nombre et sexe des nouveau-nés ;
- poids des portées à J0-J1 et à J4 post-partum ;
- développement physique, malformations ou anomalies ;
- fonctions sensorielles et réflexes ;
- survie.

– après sacrifice :
- autopsie générale ;
- pesée des organes de la reproduction des mâles (P) : testicules, épididymes ;
- examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents (testicules, épididymes, ovaires, utérus et organes sexuels secondaires) ;
- examens histologiques des organes tels que : foie, rein, surrénales, thymus, rate, cerveau, cœur, moelle épinière, estomac, intestin grêle, gros intestin, trachée, poumons, vessie, ganglions lymphatiques, nerf périphérique, moelle osseuse ;
- examen macroscopique des nouveau-nés ou des petits morts ;
- nombre de corps jaunes (facultatif) et de sites d'implantation ;

- examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents (P et F1) (testicules, épididymes, vésicules séminales, glande coagulante, prostate, ovaires, utérus, cervix, vagin, hypophyse) ;
- examen macroscopique des nouveau-nés ou des petits morts (anomalies).

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles ces effets (anomalies, action sur la reproduction, fertilité, modification du poids corporel, organes cibles, atteintes histologiques, mortalité) sont observés et doivent permettre de déterminer la dose sans effet. Ces données doivent rendre possible l'évaluation des effets sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et la croissance postnatale des nouveau-nés.

OCDE 426 : Étude de neurotoxicité pour le développement

But : Les études de neurotoxicité sur le développement ont pour objectif de produire des résultats relatifs aux effets fonctionnels et morphologiques potentiels exercés sur le système nerveux en développement de la progéniture après exposition *in utero* et aux premiers stades de la vie, notamment des caractérisations par des courbes de réponse à la dose.

Animaux d'expérience : L'espèce animale expérimentale recommandée est le rat. D'autres espèces peuvent être utilisées sous réserve de respecter certaines conditions décrites dans cette ligne directrice. Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre suffisant de femelles gravides exposées à la substance à tester afin de garantir l'obtention d'un nombre adéquat de descendants pour évaluer la neurotoxicité. Un nombre total de 20 portées est recommandé pour chaque niveau de dose.

Programmes expérimentaux : Les petits sont sélectionnés pour chaque groupe de dose et affectés à une évaluation ciblée des effets à partir du jour 4 après la naissance. La sélection des petits doit permettre, dans la mesure du possible, une représentation équilibrée des deux sexes de chaque portée, pour chaque groupe de dose, dans tous les essais. On doit utiliser trois niveaux de doses différents et un groupe témoin en parallèle. La dose élevée ne doit pas dépasser 1 000 mg/kg/jour de poids corporel, sauf exception.

La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés au minimum quotidiennement aux femelles fécondées généralement à partir du moment de l'implantation (JG- Jour de gestation 6) et jusqu'à la fin de la lactation (J21 postnatal), de façon à exposer les petits à la substance d'essai pendant le développement neurologique prénatal et postnatal. Ces moments d'administration peuvent être ajustés si besoin.

Observations

– observation des mères :

Conditions sanitaires des mères, notamment morbidité et mortalité, au moins une fois par jour. Des observations cliniques plus détaillées doivent être

réalisées périodiquement sur au moins dix mères par dose. Seront observées (liste non exhaustive) : des modifications de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, la présence de sécrétions et l'activité autonome (par exemple, larmoiement, horripilation, taille des pupilles, mode de respiration inhabituel, et/ou respiration par la bouche, et tous signes inhabituels de miction ou défécation). Il faut également noter toutes les réponses inhabituelles relatives à la position du corps, à l'intensité de l'activité et à la coordination des mouvements. Les signes de toxicité doivent être enregistrés. Les animaux sont pesés, la consommation d'aliments et d'eau est notée.

– observation de la progéniture :

Tous les petits doivent être attentivement examinés au moins quotidiennement pour détecter les signes de toxicité et déterminer la morbidité et la mortalité.

Des effets fonctionnels ou comportementaux vont être recherchés par la mesure de l'ontogénie comportementale (ex. : réflexe de redressement, géotaxie négative et activité motrice), le suivi de l'activité motrice, l'étude des fonctions motrice et sensorielle, des essais d'apprentissage et de mémoire.

Les mères sont euthanasiées après sevrage de leur progéniture. L'évaluation neuropathologique des descendants sera menée sur des tissus prélevés sur des animaux sacrifiés au 22e jour postnatal ou entre le 11e jour et 22e et également à la fin de l'étude.

Rapports et données : Le rapport d'essai doit comporter de nombreuses informations qui sont listées dans la ligne directrice. L'objectif d'une étude de neurotoxicité développementale est de fournir des informations sur les effets d'une exposition répétée à une substance pendant le développement *in utero* et postnatal précoce. L'étude est axée tant sur la toxicité générale que sur les effets neurotoxiques sur le développement, et c'est pourquoi les résultats de l'étude devront permettre de distinguer les effets neurodéveloppementaux qui apparaissent en l'absence de toxicité maternelle générale de ceux qui ne sont exprimés qu'à des doses également toxiques pour la mère. La complexité des interrelations entre le modèle de l'étude, l'analyse statistique et la signification biologique des résultats exige l'avis d'un expert pour assurer une interprétation correcte des données de neurotoxicité pour le développement. L'interprétation des résultats de l'essai observera une approche basée sur le poids de la preuve.

Composé et Imprimé par JOUVE, 1, rue du Docteur Sauvé, 53100 MAYENNE
N° 655869E – Dépôt légal : Juin 2011

Expertise collective

Reproduction et environnement

Qu'en est-il des altérations de la fonction de reproduction, en particulier chez les hommes, à travers les données épidémiologiques des différents pays ?

Quel est l'impact des substances chimiques présentes dans différents produits de notre environnement quotidien sur le développement des organes et la fonction de reproduction ?

De quelles connaissances dispose-t-on pour comprendre le mode d'action de ces substances chimiques ?

Telles sont quelques unes des questions abordées dans cette expertise collective réalisée sous l'égide de l'Inserm à la demande du ministère de la Santé.

Bisphénol A, phtalates, retardateurs de flamme polybromés, composés perfluorés et parabènes, substances chimiques présentes dans des produits de consommation, accessibles au grand public ont fait l'objet d'une analyse approfondie par un groupe pluridisciplinaire d'experts.

Prix : 50 €

ISBN 978-2-85598-890-X
ISSN 1264-1782

Inserm
www.inserm.fr