



Reproduction, développement et environnement

Sylvaine Cordier
Inserm, Rennes
Présidente du Conseil scientifique du programme
de recherche Environnement & Santé

Contexte et connaissances scientifiques

De nombreux éléments de preuve rassemblés ces dernières décennies permettent d'affirmer que certaines substances chimiques, présentes sous forme de médicaments, de contaminants de l'alimentation ou lors d'expositions professionnelles ont des effets toxiques sur la reproduction humaine et le développement embryonnaire. Ces associations ont pu être établies rapidement car certains de ces effets étaient extrêmement spécifiques et l'augmentation du risque très importante. Pour de nombreuses autres substances, présentes dans l'environnement général, la mise en évidence d'effets toxiques sur la reproduction humaine est beaucoup plus complexe mais il est pourtant vraisemblable qu'un certain nombre d'entre elles contribuent à l'apparition de ces anomalies.

L'analyse des effets sur la reproduction et le développement : un problème complexe

Toutes les phases de la reproduction allant de la fécondation au développement de l'enfant peuvent être perturbées par des facteurs exogènes. La variété des modes d'action de ces différents facteurs liée aux différentes voies et fenêtres d'exposition conduit à un grand "spectre" d'effets observables. Cette complexité est augmentée par l'absence de spécificité dans les relations exposition-impacts sur la reproduction. Ainsi une mutation dans une cellule germinale (action mutagène) peut avoir pour effet une réduction de la fertilité, un avortement spontané, des cancers ou d'autres maladies dans l'enfance. À l'inverse, un avortement spontané peut résulter d'anomalies chromosomiques, de mécanismes embryotoxiques ou fœtotoxiques.

Au cours du développement embryonnaire et fœtal, les différents organes et fonctions associées se développent à des stades différents, chacun de ces stades embryonnaires présente donc des sensibilités particulières aux toxiques. C'est essentiellement au cours du premier trimestre de la grossesse que des malformations anatomiques majeures peuvent être induites (action tératogène). Les expositions intervenant plus tard dans la grossesse peuvent éventuellement induire des malformations mineures, ou des anomalies fonctionnelles et des retards de développement chez l'enfant (action embryotoxique ou fœtotoxique).

La dose du toxique (ou le niveau d'exposition) est également un paramètre important : en effet, il existe un consensus pour admettre, que hors les substances mutagènes, une substance donnée n'a pas de toxicité embryonnaire en dessous d'un certain seuil et qu'au-delà, la gravité de l'effet augmente avec la dose, pouvant aboutir à la mort de l'embryon et entraînant un avortement spontané pas toujours cliniquement décelé.

Il faut signaler, enfin, que la gravité de l'effet d'un toxique sur la reproduction ou le développement embryonnaire est souvent influencée par d'autres facteurs environnementaux et dépend du génotype de l'embryon sur lequel il agit. Ainsi, certains agents toxiques pour une espèce ne le sont pas pour d'autres, ou pas aux mêmes doses. La présence insoupçonnée de nombreuses interactions de facteurs de l'environnement, tendant à moduler l'action toxique, est en cohérence avec la forte proportion d'anomalies de la reproduction qui reste encore inexpliquée.

En résumé, la difficulté de mettre en évidence la toxicité de certains produits pour le système reproducteur chez l'homme, tient le plus souvent à l'absence de spécificité du mécanisme (un produit peut être à la fois mutagène et embryotoxique), de l'effet (suivant la période et la dose une même exposition peut aboutir à une malformation congénitale ou un avortement spontané), et aux interactions avec d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux.

Les déterminants environnementaux des altérations de la reproduction et du développement : quelques hypothèses, trop peu de preuves

En France, une enquête réalisée en 1988-89 a montré qu'environ 14 % des couples consulteront au moins une fois pour des difficultés à concevoir. Dans la majorité des situations, un facteur féminin a été mis en cause, mais une bonne proportion des problèmes de fertilité pourrait résulter de perturbations de l'appareil reproducteur mâle.

Outre le rôle des antécédents médicaux (maladies sexuellement transmises, varicocèle, cryptorchidie), des comportements individuels (consommation de cigarettes, de cocaïne, d'alcool), des effets néfastes sur la fonction reproductrice mâle ont également été reliés à des déterminants environnementaux. Les recherches portant sur les effets délétères de contaminants de l'environnement sur la fonction reproductrice mâle se sont intensifiées au cours des dernières années, et ont permis de documenter des atteintes chez les sujets mâles de différentes espèces animales.

Une exposition à des températures élevées, aux radiations ionisantes, à des produits chimiques (plomb, certains éthers de glycol, certains pesticides comme le chlordécone et le dibromochloropropane (DBCP)) sont des facteurs de risque reconnus. Des situations professionnelles comme les postes de soudage, semblent affecter également la fonction de reproduction masculine.

Chez l'homme, la diminution de la qualité du sperme depuis les cinquante dernières années, de même que l'augmentation de l'incidence de désordres testiculaires constituent la base de l'hypothèse voulant que des composés chimiques de l'environnement, capables de mimer les effets des hormones sexuelles endogènes, soient à l'origine de désordres de la fonction reproductrice mâle.

De façon plus précise, on discute surtout à l'heure actuelle de la possibilité qu'une exposition in utero à des substances possédant des propriétés oestrogéniques puisse être à l'origine d'une grande variété d'effets adverses tels que les cancers en particulier le cancer du sein, de la prostate et des testicules (voire section C, Cancer et Environnement), l'endométriose chez la femme et dans les deux sexes des problèmes de fertilité, de malformation du système reproducteur, des modifications du comportement sexuel, des retards d'apprentissage dans la petite enfance, ainsi que des effets adverses sur le système immunitaire et la fonction thyroïdienne.

Ces effets seraient causés par des perturbations hormonales se produisant à un moment inopportun du développement intra-utérin. Cette hypothèse s'appuie en partie sur les effets néfastes qu'a engendré l'administration de diéthylstilbestrol (DES), un oestrogène de synthèse, à plusieurs millions de femmes qui présentaient des antécédents d'avortements spontanés. En théorie, un blocage de l'action des androgènes ou un stimulus oestrogénique à des moments inopportuns de la grossesse pourraient tous deux induire une altération du développement de l'appareil reproducteur mâle. Ainsi, par exemple, le principal métabolite du pesticide DDT, le o,p'-DDE, est un puissant antagoniste des androgènes chez le rat. L'o,p'-DDT et de nombreux autres composés pour lesquels des propriétés similaires ont récemment été découvertes (chlordécone, dieldrin, endosulfan, beta-hexachlorocyclohexane, p,p'-méthoxychlor, alkylphénols), pourraient perturber le développement de l'appareil reproducteur mâle, tel que le suggère l'exemple du DES. Cependant, des test in vitro et in vivo semblent indiquer que ces substances, excepté le DES, seraient beaucoup moins actives que l'oestradiol, hormone naturelle utilisée comme référence.

Le rôle de l'environnement sur l'infertilité féminine a fait l'objet de beaucoup moins de travaux, en particulier car il est très difficile d'explorer le bon déroulement des toutes premières étapes du développement embryonnaire, qui suivent la fécondation et précèdent l'implantation dans l'utérus. De même, une altération de la fonction ovarienne est difficile à mesurer. Certaines études chez des femmes professionnellement exposées ont enregistré les perturbations des cycles menstruels et de la durée des menstruations, mais la multiplicité des facteurs qui affectent ces paramètres chez la femme en font des indicateurs peu spécifiques.

Jusqu'à présent, bien que l'hypothèse soit plausible d'un point de vue biologique, il n'existe pas de preuves solides que l'exposition environnementale aux « perturbateurs endocriniens » puisse être à l'origine d'altération de la reproduction chez l'humain.

Les altérations du développement fœtal et du jeune enfant

Environ 10 à 20 % des grossesses reconnues se terminent par un avortement spontané (avant 22 semaines de gestation). 30 à 50 % des avortements spontanés sont porteurs d'une anomalie chromosomique du produit de conception (contre seulement 6 % des morts périnatales et moins de 1 % des naissances). Les morts fœtales tardives supérieur à 22 semaines, les morts nés et les morts néonatales précoces avant le 8^{ème} jour sont comptabilisés dans la mortalité périnatale. En France en 1991, elle était de 8,2 pour 1000 naissances. La prématurité est définie comme un accouchement survenant avant 37 semaines révolues d'aménorrhée. En France, en 1998, le taux de prématurité a été estimé à 6,2 % des naissances. Le retard de croissance intra-utérin est défini par un poids à la naissance inférieur à une valeur seuil dépendant de l'âge gestationnel et du sexe du nouveau-né et le plus souvent, ce seuil correspond au dixième ou cinquième percentile de la distribution des poids de naissance de la population générale, il atteint environ 6 % des naissances. Les malformations congénitales majeures affectent environ 1 à 2 % des naissances.

Historiquement, les facteurs de risque de malformations congénitales ont été surveillés depuis longtemps, surtout pour identifier les effets secondaires des médicaments pris pendant la grossesse. Ceci a pu se faire grâce à la mise en place de registres de malformations dans le monde, suite à la mise en évidence des effets tératogènes massifs de la thalidomide, médicament antinauséeux prescrit pendant la grossesse dès les années 1950. Une estimation des risques attribuables à différentes causes de malformations faite en 1983 n'identifiait des causes environnementales probables que pour une faible partie d'entre elles (environ 2-3 %). Parmi les autres causes, figurent les infections maternelles, les maladies métaboliques de la mère, les médicaments les facteurs génétiques et les interactions gènes-environnement. Aujourd'hui, on considère encore qu'environ 60 % des malformations congénitales n'ont pas de cause identifiée.

Les premières associations entre facteurs d'environnement et malformations congénitales ont été observées lors d'expositions exceptionnelles. A Hiroshima et Nagasaki, les survivants exposés in utero aux radiations présentaient des signes de microcéphalie et de retard mental. A Minamata, au Japon à nouveau, la consommation, par les mères, de poisson contaminé par le méthylmercure a produit des syndromes neurologiques graves chez les enfants. A Yusho enfin et Yucheng (Taïwan), l'ingestion d'huile contaminée par des polychlorobiphényles (PCBs) pendant la grossesse, a provoqué l'apparition d'hyperpigmentation chez les nouveau-nés, puis de retards du développement neurocomportemental chez les enfants.

Depuis, en complément des systèmes de surveillance, un grand nombre d'études épidémiologiques ont permis d'identifier des produits potentiellement associés, voire certainement, à des anomalies du développement comme les avortements spontanés, les malformations congénitales ou les retards de développement neurocomportemental de l'enfant, lors d'une exposition maternelle. Les radiations ionisantes, le mercure, le plomb, les PCBs et dioxines, certains solvants et pesticides, certains gaz anesthésiants sont concernés par ces associations. Ces mêmes substances ont également été associées à un excès de risque d'avortements spontanés lors d'expositions paternelles mais la relation est moins fermement établie.

Le développement du système nerveux central est un processus particulièrement sensible aux expositions toxiques survenant in utero et dans l'enfance compte-tenu de sa durée de développement beaucoup plus longue que celle des autres systèmes. L'évaluation de ses atteintes est complexe car elle doit faire appel à des tests neurologiques, psychométriques ou neurophysiologiques. L'influence possible de facteurs de l'environnement a récemment été évoquée pour expliquer l'augmentation de l'incidence de pathologies telles que l'autisme ou le syndrome d'hyperactivité et déficit d'attention (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD).

Concernant la prématurité ou le retard de croissance intra-utérin, il n'y a pas d'évidence forte du rôle étiologique d'une exposition professionnelle ou environnementale à des substances chimiques ou agents physiques. Seule l'exposition au plomb semble augmenter le risque de retard de croissance intra-utérin; ce risque a été identifié pour l'exposition maternelle au travers de plusieurs études, il a également été rapporté un cas d'exposition paternelle. Par ailleurs, la littérature récente sur les toxiques chimiques de l'environnement évoque une augmentation de la fréquence de retard de croissance intra-utérin dans des populations exposées notamment aux trihalométhanes –sous-produits de chloration de l'eau– ou à certains herbicides ou résidus d'insecticides type DDT, à la pollution de l'air, observations qui doivent être confirmées.

Les difficultés à conduire des études épidémiologiques dans ce champ sont telles que, alors que chez l'animal plusieurs milliers de produits ont été identifiés comme toxiques pour la reproduction, seuls quelques dizaines (incluant les médicaments) sont des produits toxiques confirmés pour la reproduction humaine. Pourtant parmi les tératogènes connus, les doses seuil traduisent une plus grande sensibilité de l'homme à ces substances (de l'ordre d'un facteur 10, jusqu'à 100 pour les PCBs).

Références bibliographiques

Cordier S, Ayotte P, De Wals P, Ducot B, Dodin S, Saurel-Cubizolles MJ and Thoneau P.(2003). Reproduction. In: Gérin M, Gosselin, P, Cordier, S, Viau, C., Quénel, P, and Dewailly, E., editor. Environnement et santé publique. Fondements et pratiques. Montréal, Paris: edisem inc., Tec & Doc, p. 641-667.

Présentation des projets

Entre 1996 et 2000, sur les quinze projets relevant du champ de la reproduction et du développement, neuf d'entre eux ont porté sur le mode d'action et les effets de produits soupçonnés d'agir comme perturbateurs endocriniens, trois se sont intéressés aux conséquences d'expositions in utero sur le développement neurocomportemental des enfants, trois autres enfin ont étudié les effets reprotoxiques du plomb, ou des solvants en particulier les éthers de glycol.

● Impact et modes d'actions de perturbateurs endocriniens

Le nonylphénol est un composant de l'industrie des matières plastiques et de la fabrication des détergents ; son utilisation fréquente et sa grande stabilité ont pour conséquence une contamination des cours d'eau et des risques de bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire. Il apparaît cependant que chez les mammifères, ce contaminant est rapidement absorbé et éliminé grâce à des systèmes métaboliques efficaces. Une bioaccumulation dans les tissus est donc peu probable, limitant ainsi la dangerosité de ce produit (Cravedi et al., 1999). On a pu montrer aussi que le pouvoir de perturbation endocrinienne (oestrogénomimétique ou «estrogen-like»), et les niveaux d'exposition pour le

consommateur des phtalates et du bisphénol A, constituants des emballages alimentaires, sont nettement inférieurs à ceux de certains produits naturels présents dans notre alimentation comme les phyto-oestrogènes (Lhuguenot JC et al., 2000). Il apparaît également que la protéine de liaison humaine des stéroïdes sexuels SHBG (Sex-Hormone-Binding Globulin) limite la diffusion du bisphénol A vers des organes cibles notamment le foie et les testicules (Pugeat et al., 1997).

L'impact des perturbateurs endocriniens a été étudié dans différents systèmes expérimentaux. De fortes concentrations de trois pesticides utilisés pour certains jusqu'à une date récente dans certaines régions françaises (lindane, méthoxychlore et dieldrine) altèrent la maturation des ovocytes (ovules) et la fécondation de certaines espèces d'invertébrés marins et de la souris, suggérant un impact possible de ces produits sur l'écosystème marin et potentiellement chez l'homme lors de circonstances d'expositions exceptionnelles (Ciapa B et al., 1997).

Outre ses effets sur le développement neurologique de l'enfant, le plomb est soupçonné d'avoir d'autres cibles dans le système reproducteur. Des expériences réalisées chez la souris et dans des cellules humaines in vitro ont montré une atteinte de la fonction ovarienne pouvant avoir pour conséquence une hypofertilité chez la femme par un mécanisme de perturbation hormonale (Machelon V et al., 1999).

Le développement testiculaire pendant la gestation est une des cibles potentielles des perturbateurs endocriniens. Un système de culture de cellules testiculaires a permis d'identifier le mécanisme d'action du bisphénol A, plus particulièrement sur les gonocytes, en même temps qu'était testé sur ce modèle l'impact de substances à activité oestrogénique puissante comme l'oestradiol et un médicament, le diethylstilbestrol (Jégou Bet al., 1998). Ces résultats obtenus in vitro n'ont cependant pas été confirmés in vivo lors de l'exposition de la souris en cours de gestation à des concentrations de ce même bisphénol A couramment rencontrées dans les populations humaines (Le Magueresse-Battistoni B et al., 2000). Dans cette expérience, un passage transplacentaire a été mis en évidence mais aucun effet sur le développement testiculaire n'a été décelé. Par ailleurs, le bisphénol A et l'atrazine (herbicide utilisé en grandes quantités dans le monde) présents dans l'eau de boisson à des concentrations comprises entre 1mM et 10 mM induisent in vivo chez le rat des perturbations du processus de formation osseuse au cours du développement embryonnaire. Ces données confirment les résultats obtenus in vitro sur les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) isolées à partir d'os de rats nouveau-nés femelle ou mâle mettant en jeu les récepteurs des oestrogènes ou ceux des androgènes suivant le sexe de l'animal. Cependant, ces molécules n'ont aucun effet sur les cellules osseuses provenant de rat au sevrage ou adulte (Lieberherr M et al., 2000). Ces résultats confirment que l'évaluation du risque pour l'homme exige la confrontation de différentes méthodologies expérimentales.

Les conséquences de l'utilisation agricole intensive de pesticides depuis des décennies en culture tropicale ont été évaluées en Guadeloupe sur la fonction de reproduction de mammifères sauvages. Les animaux capturés dans les bananeraies (où les pesticides ont surtout été utilisés) ont des organes génitaux plus petits et des taux de testostérone plus faibles que ceux d'animaux de même âge capturés sur la côte, mettant ainsi en évidence un effet probable de cet environnement sur la fonction de reproduction mâle (Multigner L et al., 1999).

Actuellement, peu d'études ont été réalisées sur les conséquences possibles de la perturbation endocrinienne dans les populations humaines. Une étude française, intégrée dans un réseau Européen, a confirmé l'existence de variations géographiques de la qualité du sperme dans différentes régions françaises et européennes ainsi que le déclin de la qualité spermatique dans ces mêmes régions au cours des dernières décennies (Jouannet A et al., 1996).

Effets sur le développement neuro comportemental de l'enfant

Bien que les effets sur le développement neurocomportemental de l'enfant de substances comme le plomb, le mercure ou les polychlorobiphényles (PCBs) soient connus depuis longtemps, des incertitudes subsistent quant aux doses auxquelles elles agissent ainsi que sur leur mécanisme d'action. La mise en évidence de gènes exprimés lors de l'exposition aux PCBs pourrait permettre de disposer d'un modèle prédictif de la neurotoxicité de ces substances. Des travaux de ce type ont été entrepris avec pour objectif d'examiner la possibilité d'identifier des indicateurs biologiques de niveau d'exposition aux PCBs (Francon J, 1999). Plusieurs gènes, dont l'expression est modulée par les PCBs ont été identifiés. Cependant, les variations observées ne permettent pas actuellement d'étudier l'effet dose-réponse des PCBs et d'envisager leur utilisation en tant que marqueur d'exposition.

Au cours d'un suivi de près de 20 ans d'une cohorte d'enfants dont l'exposition in utero au plomb a pu être quantifiée, des associations inverses ont été observées à 6 ans avec les performances sur des tests de cognition, de mémoire et verbaux et à un moindre degré les performances motrices et perceptives. A l'adolescence (17-18 ans), des altérations de performances cognitives ou motrices ne sont plus perceptibles suggérant une réversibilité des effets antérieurs. La mémoire par contre continue d'être affectée à l'adolescence (Huel G et al., 1996).

Les activités d'orpaillage ont entraîné depuis des décennies une contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire par le méthylmercure en Guyane. Les populations grosses consommatrices de poissons, en particulier les

populations amérindiennes dont c'est la principale source de protéines, sont particulièrement vulnérables et, comme cela avait déjà été suggéré en Amazonie Brésilienne, on a pu constater que les niveaux d'exposition auxquelles elles sont soumises entraînent de légers déficits de performances sur la motricité et l'organisation visuospatiale chez les enfants (Cordier S et al., 1996).

Autres effets sur la reproduction

Les éthers de glycol sont une classe de solvants dont l'usage s'est développé depuis les années 1970. Certains d'entre eux parmi les plus utilisés à cette époque, ont des effets démontrés chez l'animal en particulier sur la fertilité et l'embryogenèse. La question se pose donc d'évaluer l'impact du contact avec ces produits dans les populations professionnellement exposées. Une étude réalisée chez les employés de la Ville de Paris n'a pas permis de mettre en évidence d'association entre l'exposition actuelle aux éthers de glycol (telle que validée par des biomarqueurs urinaires), les caractéristiques du sperme et les niveaux d'hormones. Par contre l'estimation des expositions passées aux éthers de glycol semble associée à un déficit de certains paramètres (concentration du sperme...), ces observations pouvant résulter de l'utilisation dans le passé de produits de la même famille, beaucoup plus toxiques pour la reproduction (Multigner L et al., 1996).

Le risque de malformations congénitales (fentes labiales ou palatines) liées à l'utilisation professionnelle de ces solvants pendant la grossesse a également été évalué. Cette étude confirme une association avec l'exposition aux solvants type éthers de glycol, mais l'existence de co-expositions à d'autres polluants, en particulier à d'autres solvants, rend l'établissement de la causalité difficile. La mise en évidence de susceptibilités génétiques grâce à l'étude des polymorphismes de gènes important pour le métabolisme (alcool-déshydrogénase, CYP450) ou intervenant dans la détoxification (glutathion-s-transférase) de ces substances devrait permettre de définir des sous-groupes à risque et les mécanismes d'action de ces produits (Cordier S et al., 1998).

Synthèse & perspectives

L'étude de l'impact de l'environnement sur la reproduction au sens large (intégrant le développement intra utérin) est encore un champ de recherches en émergence. Il est particulièrement complexe car trois individus, recevant des expositions différentes et porteurs de susceptibilité propre à chacun, sont en jeu : la mère, le père et l'enfant en devenir. Un autre élément contribue à cette complexité, les relations dose-effet, qui conduisent en général à observer que la fréquence d'une atteinte augmente avec la dose de l'exposition à un toxique, sont ici souvent non linéaires. Ceci est dû à l'existence de périodes de vulnérabilité variables, à l'action probable et simultanée de mécanismes biologiques encore trop mal connus comme ceux induit par les perturbations endocriniennes. Ces caractéristiques rendent l'identification de produits dangereux particulièrement difficile.

Ce champ de recherches a reçu jusqu'à présent un soutien limité des pouvoirs publics tant il est vrai que les travaux visant à l'amélioration de la prise en charge médicale de la grossesse et du nouveau-né ont supprimé des facteurs de risque majeurs d'issues de grossesse défavorables et que le développement des techniques de fécondation artificielle a contribué à rendre plus acceptables les difficultés de procréation pour la population.

Concernant les besoins de connaissances on peut identifier un certains nombres de priorités :

- l'identification précoce des substances potentiellement «reprotoxiques» lors de leur mise sur le marché.
- le développement in vitro de marqueurs biologiques signant des mécanismes d'action nouveaux comme celui de la perturbation endocrinienne ou celui d'une atteinte des cellules germinales. A moyen terme l'utilisation de ces marqueurs pour l'homme serait souhaitable,
- le développement de tests multigénérationnels permettant de mesurer l'impact d'agent mutagènes ou tératogènes sur plusieurs générations.
- le renforcement des connaissances sur les autres facteurs, exogènes ou individuels, favorisant ou atténuant les effets reprotoxiques. Il est vraisemblable en effet que les facteurs génétiques jouent un rôle prépondérant dans ce domaine.
- le développement de méthodologies visant à améliorer la précision des mesures d'exposition individuelle aux contaminants de l'environnement dans les études épidémiologiques, prise en compte des périodes clés du développement. Les quelques études épidémiologiques récentes qui se sont donné les moyens d'intégrer des mesures d'exposition précises sur la contamination des eaux (sous-produits de la chloration par exemple), de l'air (HPA), des aliments (mercure, pesticides) ou de certaines expositions professionnelles ont pu mettre en évidence des atteintes précédemment insoupçonnées. Ces études restent encore rares et n'ont certainement pas encore permis d'évaluer l'ampleur du risque pour la santé publique et encore moins de produire des outils d'aide à la prévention.

Les équipes françaises mobilisées autour de ce thème sont encore peu nombreuses et contribuent insuffisamment à la production de connaissances nécessaires à l'expertise dans ce domaine, malgré des situations d'expositions environnementales préoccupantes en France (incinération, trafic routier, pollutions agricoles, etc.).

Les sources de financement dans ce domaine sont extrêmement limitées et le programme Environnement & Santé a contribué de façon déterminante aux travaux qui ont pu être réalisés en France. Les effets des pollutions environnementales actuellement redoutés, qu'ils concernent par exemple une détérioration de la qualité des cellules germinales ou des retards de développement intellectuel chez l'enfant, portent potentiellement atteinte à la qualité des espèces et à l'espèce humaine en particulier justifiant une intensification des travaux de recherche dans ce domaine, tant pour l'identification des agents toxiques que pour l'évaluation de l'efficacité des mesures de réduction des expositions.

Résumés des projets

Qualité du sperme, fonction de reproduction et fertilité chez l'homme, facteurs de variation et environnement

Jacques Auger et P. Jouannet et al., 1996

La responsabilité de facteurs environnementaux est régulièrement suggérée pour expliquer l'augmentation progressive et les variations géographiques des altérations de la fonction de reproduction. La plupart des conclusions sont formulées à partir d'analyse rétrospective de données acquises dans des contextes et des méthodologies variables.

L'objectif principal de cette étude était de définir les conditions selon lesquelles pouvaient être recrutés des hommes fertiles afin d'étudier l'influence des facteurs environnementaux sur la fonction de reproduction :

- mise en place d'un recrutement de volontaires partenaires de femmes enceintes à partir des consultations prénatales d'un hôpital parisien. Ces hommes devaient d'une part remplir un questionnaire (relatif aux antécédents médicochirurgicaux, aux conditions de vie et de travail, aux conditions d'obtention de grossesse) et d'autre part accepter un examen clinique des dosages hormonaux et un examen de sperme ;
- étude de faisabilité de recrutement d'hommes fertiles dans 6 CECOS (Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains), répartis sur l'ensemble du territoire, pour la mise en place d'un protocole multicentrique beaucoup plus vaste ;
- analyses de données collectées par les CECOS depuis 1973 pour discuter les variations séculaires et géographiques de la qualité du sperme humain en France ;
- standardisation et mise au point d'un contrôle de qualité des méthodes d'analyse du sperme, évaluation de nouvelles méthodes de mesures objectives des paramètres spermatiques utiles pour les études épidémiologiques.

Cette étude a montré qu'il était possible de recruter des hommes partenaires de femmes enceintes sans proposer d'indemnité, il est cependant indispensable de s'appuyer pour ce recrutement sur des personnes spécifiquement formées à la communication et à la formation. Le bilan de recrutement dans les CECOS a en revanche été négatif et aurait nécessité de confier cette tâche à une personne spécifiquement formée.

Les résultats de l'étude rétrospective confirment l'existence d'une très probable baisse de la qualité du sperme principalement liée à l'année de naissance. Une différence significative de la qualité du sperme d'homme fécond a été par ailleurs observée dans différentes villes françaises.

Des données de référence sur la qualité du sperme et le délai à concevoir (DNC) d'une population assez homogène d'hommes féconds ont pu être obtenues. Par contre, la taille de la population d'hommes recrutés à Paris n'a pas permis une analyse précise des relations entre caractéristique spermatiques, DNC et les facteurs environnementaux et de mode de vie collectés par questionnaire. Cependant, grâce à un protocole similaire mené conjointement au niveau européen, ce travail fait état de différences géographiques de la qualité du sperme et du DNC.

Ce projet a conduit au développement d'une méthode de mesure de la concentration spermatique, dont les avantages sur les méthodes classiques ont été démontrés.

Publications issues de ce projet

Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. Federation Francaise des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. Hum Reprod 1997;12(4):740-5.

Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Hum Reprod 2000;15(11):2360-8.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2710-7.

Eustache F, Jouannet P, Auger J. Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *J Androl* 2001;22(4):558-67.

Jensen TK, Slama R, Ducot B, Suominen J, Cawood EH, Andersen AG, et al. Regional differences in waiting time to pregnancy among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2697-704.

Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001;16(5):1012-9.

Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17(2):503-15.

Impact des contaminants des eaux de boissons et de surface sur la maturation et la fécondation des ovocytes

Brigitte Ciapa et al., 1997

Ce projet avait pour objet l'étude de l'impact des pesticides sur la maturation et la fécondation des ovocytes de trois espèces animales différentes : deux invertébrés marins (l'oursin et l'étoile de mer) et un mammifère (la souris). En effet, certains de ces composés sont dits "oestrogéniques" car ils peuvent se comporter comme des xéno-oestrogènes, et mimer l'action d'une des principales hormones femelles, l'oestradiol. Le choix des pesticides testés était guidé par des résultats d'analyse effectuées par la DDASS du Finistère dans les années 1990 qui ont mis en évidence la présence du lindane, largement utilisé en agriculture, du méthoxychlor (ou MXC, un dichlorodiphényléthane) et de la dieldrine (un cyclodiène) dans les eaux courantes.

L'analyse de la vitesse de dégradation et d'élimination de ces composés dans l'environnement ou dans les organismes a mis en évidence une bio-accumulation de ces molécules. Leurs effets peuvent donc être persistants et l'exposition à long terme, même à de faibles doses, peut conduire à leur accumulation dans certains tissus animaux.

En particulier, des quantités non négligeables de certains pesticides peuvent s'accumuler dans le tissu ovarien, les embryons et fœtus humains. Lindane, dieldrine et MXC ont ainsi pu être détectés dans les ovaires, les liquides folliculaires et les tissus utérins.

La maturation est une étape nécessaire dépendante de l'action d'hormones, dont l'oestradiol, et conduit à la formation d'ovocytes capables d'être fécondés. Cette étude suggère que les trois composés sont capables d'altérer la maturation des ovocytes chez l'étoile de mer comme chez la souris. Une altération de la fécondation a également été montrée, chez l'oursin ou l'étoile de mer. L'activation (reprise du cycle de méiose qui fait normalement suite à la fécondation) spontanée intervient pour un pourcentage élevé d'ovocytes de souris traités avec ces pesticides.

La contamination de l'eau de mer par les pesticides peut donc affecter différents stades du développement embryonnaire. Les effets observés ont été obtenus à de fortes concentrations de pesticides. Cependant, il reste possible que les organismes tels que l'oursin, capable de filtrer de grandes quantités d'eau, accumulent des doses non négligeables de ces produits dans certains tissus. Enfin, l'homme pourrait être en contact avec des fortes concentrations de ces pesticides en cas d'incidents majeurs, dans des zones polluées où ces produits ne sont pas manipulés avec toutes les précautions nécessaires, en particulier dans les pays en voie de développement.

Publications issues de ce projet

Picard A, Palavan G, Robert S, Pesando D, Ciapa B. Effect of organochlorine pesticides on maturation of starfish and mouse oocytes. *Toxicol Sci* 2003;73(1):141-8.

Pesando D, Robert S, Huitorel P, Gutknecht E, Pereira L, Girard JP, et al. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat Toxicol* 2004;66(3):225-39.

Risques neurotoxiques chez l'enfant liés à l'exposition au méthylmercure en Guyane Française

Sylvaine Cordier et al., 1996

La neurotoxicité du méthylmercure est connue depuis la catastrophe de Minamata au Japon dans les années 1950, où plusieurs centaines de personnes ont été atteintes de désordres neurologiques graves souvent irréversibles, suite à la consommation régulière de poisson contaminé par du méthylmercure. Des enfants ayant de sévères atteintes neurologiques sont nés de mères ne montrant pratiquement aucun symptôme. Une autre épidémie en Irak en 1971-1972, due à l'ingestion de farines contaminées, a permis de mieux quantifier la relation entre l'exposition et les atteintes observées. On admet généralement que des expositions résultant en des concentrations maternelles dans le cheveu de l'ordre de 10-20 g/g sont susceptibles d'accroître le risque d'atteinte cérébrale chez le fœtus, provoquant des perturbations du développement moteur telles qu'un retard d'apprentissage de la marche. Plus récemment, des études ont recherché des effets plus fins en mesurant le développement neurocomportemental de l'enfant à l'aide de tests psychologiques ou de motricité, à différents âges, en relation avec une exposition prénatale au méthylmercure, aux Seychelles ou en Nouvelle-Zélande, dans des populations consommatrices régulières de poisson. Les observations publiées récemment sur une cohorte d'enfants des Iles Féroé semblent indiquer des effets neuropsychologiques à des niveaux d'exposition inférieurs à 10 g/g dans le cheveu maternel.

Notre étude a été initiée dans le cadre d'un programme visant à évaluer les conséquences environnementales et sanitaires de la pollution par le mercure en Guyane Française liée aux activités d'orpaillage, plus particulièrement dans les villages amérindiens du Haut-Maroni où l'exposition des populations est la plus forte.

Un examen neurologique et neuropsychologique des enfants a été conduit entre 1997 et 1998 dans trois communautés amérindiennes de Guyane : le Haut Maroni (Cayodé, Elahé, Twenke, Taluhen et Antecume-Pata), Camopi et Awala. Les niveaux individuels d'exposition au méthylmercure ont été mesurés par détermination du mercure total dans les cheveux des enfants et de leurs mères. Un questionnaire standardisé rempli avec la mère a permis d'évaluer les paramètres sociodémographiques et médicaux. L'examen neurologique a été réalisé par trois médecins et neuropédiatres sur les enfants âgés de 9 mois à 6 ans (97 enfants dans le Haut Maroni, 69 à Camopi et 82 à Awala de même âge et sexe). Des relations ont été mises en évidence entre l'exposition au mercure et la présence de réflexes ostéotendineux accrus et une moins bonne coordination des jambes. L'examen neuropsychologique conduit par trois psychologues a porté sur les enfants de 5 à 12 ans (103 enfants dans le Haut-Maroni et 103 à Awala de même âge et même sexe). Il a mis en évidence une association entre le niveau d'exposition au mercure et un déficit de performance dans les tests mesurant en particulier les capacités d'organisation visuospatiale. Ce déficit est plus marqué chez les garçons. La prise en compte des caractéristiques médicales, sociodémographiques ou les habitudes de vie ne modifie pas les relations observées.

En conclusion, il n'a pas été observé de déficiences majeures en relation avec l'exposition au mercure, mais les signes mis en évidence confirment le rôle toxique probable du méthylmercure sur les fonctions neurologiques et intellectuelles dans ces populations. Ils sont en accord avec d'autres études en cours sur des populations semblables dans le monde. Ils soulignent la nécessité de mettre en place rapidement des mesures visant à réduire l'exposition de ces populations au mercure.

Publications issues de ce projet

Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, Josse D, White R, Amiel-Tison C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ. Res.* 2002; 89 (1): 1-11

Exposition maternelle aux solvants, susceptibilité génétique et risque de fente orale

Sylvaine Cordier et al., 1998

La prévalence des malformations congénitales à la naissance est de l'ordre de 2 pour 100 naissances. Avec la réduction de la fréquence des pathologies infectieuses néonatales et de la prématurité, elles sont devenues, dans les pays occidentaux, une source majeure de mortalité et de morbidité néonatales et infantiles. Leur étiologie est complexe et le plus souvent sous la double dépendance de facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les malformations congénitales, les fentes labiales et palatines (environ 1 pour 700 naissances) semblent particulièrement sensibles aux expositions environnementales sans que des facteurs étiologiques aient été identifiés avec certitude. Parmi ceux-ci, ont été évoqués la consommation de tabac maternel pendant la grossesse, la consommation d'alcool et les apports en vitamines.

Lors d'une étude précédente, nous avons mis en évidence le rôle possible de l'exposition professionnelle maternelle aux solvants pendant la grossesse dans la survenue de malformations congénitales. Pour confirmer cette association, nous avons comparé des familles d'enfants atteints de bec de lièvre et traités par chirurgie maxillo-faciale dans des

hôpitaux de Lyon, Paris, Clermont-Ferrand et Grenoble, à des familles d'enfants témoins. A l'occasion d'un entretien avec la mère, des questions ont porté sur le déroulement de la grossesse, l'alimentation, les expositions professionnelles et l'environnement dans lequel vit la famille. Des prélèvements de sang de l'enfant et de ses parents ont permis de caractériser les systèmes enzymatiques, variables d'une personne à l'autre, qui peuvent modifier les réactions de l'individu à son environnement. Ces variations ont été examinées en regard des malformations congénitales observées.

Nos résultats confirment des augmentations de risque de bec de lièvre, en relation avec la consommation de tabac et la consommation d'alcool au 1er trimestre de la grossesse. Parmi les professions occupées par les mères de cas et de témoins au 1er trimestre de la grossesse, les ouvrières sont nettement plus représentées chez les mères de cas que de témoins, en particulier les couturières et les préposées à l'emballage.

Les risques relatifs associés à l'exposition à différentes classes de solvants (oxygénés, chlorés, pétroliers) sont en général supérieurs à 1, surtout pour la classe des solvants chlorés. Parmi les autres produits on trouve en excès les composés du plomb et les expositions aux rayonnements électromagnétiques de «extrêmement basse fréquence». L'exposition aux éthers de glycol montre des relations dose-effet avec le risque de becs de lièvre, relations qui vont dans le même sens que nos résultats précédents.

La caractérisation de la susceptibilité génétique individuelle des enfants et de leurs parents à la recherche d'interactions gènes-environnement est actuellement encore en cours. Les premières analyses des facteurs génétiques ont porté sur le gène ADH3 (alcool déshydrogénase) qui métabolise les alcools. Elles mettent en évidence un certain degré de protection vis à vis du risque de bec de lièvre, chez les enfants porteurs d'une certaine forme du gène ADH3 (génotype). Malgré le rôle probable de l'ADH3 dans la métabolisation des alcools, le caractère protecteur d'un fond génétique donné (ici représenté par les formes variables du gène ADH3) semble s'exprimer indépendamment de l'exposition maternelle à l'alcool ou aux éthers de glycol. En d'autres termes, il n'y aurait pas d'interaction gène-environnement entre ce génotype et l'exposition aux alcools. Ainsi, l'expression des formes variables du gène ADH3 ne dépendrait pas d'une exposition à un environnement particulier. Les analyses génétiques ne sont pas terminées et un bon nombre d'hypothèses génétiques et d'interactions gène-environnement restent à explorer à partir de cette étude.

Publications issues de ce projet

Chevrier C, Perret C, Bahau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert Gnansia E, Cordier S. Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts : An evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004 Dec 15

Métabolisme chez le rat et chez l'homme d'un xénoestrogène : le nonylphénol

Jean-Pierre Cravedi et al., 1997

Certains contaminants d'origine industrielle présentent des propriétés hormonales. Il peut s'agir de propriétés estrogéniques (semblables à celles des hormones femelles) ou anti-androgéniques (empêchant l'action d'hormones mâles). Ces substances, appelées xéno-estrogènes, sont susceptibles d'agir sur le système endocrinien des animaux et de l'Homme. Parmi elles, le nonylphénol est utilisé dans l'industrie des matières plastiques et dans la fabrication de détergents. Son utilisation fréquente et sa stabilité ont pour conséquence une contamination des cours d'eau et des risques de bioaccumulation dans la chaîne trophique. Il est présent en grandes quantités dans les boues de stations d'épuration. Au cours des 8 dernières années, les propriétés estrogéniques du nonylphénol ont été décrites in vitro et in vivo chez les poissons et les mammifères.

Ces propriétés chimiques et biologiques peuvent faire craindre que le nonylphénol présente un risque pour la santé de l'homme en perturbant son équilibre hormonal. Parmi les questions posées au démarrage de l'étude, certaines concernaient le mode d'action de ce type de substance et d'autres avaient pour objet son devenir dans l'organisme. C'est essentiellement à ce second volet que nous nous sommes intéressés en cherchant à apporter des éléments de réponses à ces différentes questions :

- Dans quelle mesure le nonylphénol peut-il être absorbé lorsqu'il est ingéré ?
- Quels sont les tissus susceptibles d'être prioritairement contaminés ?
- Est-ce que les mammifères, dont l'homme, sont capables d'éliminer le nonylphénol ?
 - Cette élimination est-elle rapide ?
 - Nécessite-t-elle une transformation préalable de la substance ?
 - Si une transformation avait lieu, pourrait-elle entraîner la formation de composés encore plus actifs que le produit d'origine ?

- Ces processus sont-ils différents chez les mâles et les femelles ?
- Le devenir du nonylphénol dépend-il de la dose ?
- L'homme possède-t-il les mêmes mécanismes de défense que le rat vis-à-vis de ce composé ?

Grâce à des travaux faisant intervenir des molécules radioactives de nonylphénol, et mettant en œuvre des expérimentations sur le rat et sur des cellules hépatiques humaines, nous avons pu montrer que ce contaminant était rapidement absorbé et éliminé. Peu de résidus restent présents dans les tissus après la contamination. Cette élimination est essentiellement due à des mécanismes de transformation (métabolisation) efficaces qui ont lieu dans le foie. C'est du reste dans cet organe que les concentrations en nonylphénol sont les plus importantes, après le tube digestif. Les mêmes voies de métabolisation sont utilisées par le rat et l'homme pour éliminer le nonylphénol, que l'on retrouve en grande partie dans l'urine sous forme de produits transformés.

Les produits de transformation ont totalement ou partiellement perdu les propriétés estrogéniques du nonylphénol. Ces mécanismes d'élimination sont aussi efficaces à faible dose (1µg/kg) qu'à forte dose (10mg/kg) et peu de différences ont été observées entre mâles et femelles.

Bien que le nonylphénol soit capable, dans une certaine mesure, de perturber les mécanismes de régulation hormonale, les mammifères ont la capacité, grâce à leurs systèmes métaboliques, d'inactiver et d'éliminer efficacement ce composé. Il est de ce fait peu probable de voir ce type de substance persister longtemps dans les tissus ou s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

Publications issues de ce projet

Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi JP. In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab Dispos* 2003;31(2):168-78.

Identification de gènes dont l'expression est altérée par les biphényles polychlorés (PCBs) au cours du développement du système nerveux central Relations avec la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes Conception et développement de tests de neurotoxicité Jacques Francon et al., 1999

Les biphényles polychlorés (PCBs) sont parmi les substances chimiques dont la présence persistante dans les sols et dans les eaux - et par voie de conséquence dans les aliments - est préoccupante pour la santé de l'Homme. Ces substances sont considérées comme neurotoxiques lors du développement embryofœtal des mammifères.

L'objectif du projet était de déterminer si l'effet neurotoxique des PCBs est dû à une modification de l'expression de certains gènes, au cours du développement embryonnaire et post-natal précoce du système nerveux central (SNC) des mammifères. Le niveau d'expression de ces gènes pourrait servir d'indicateur biologique d'exposition aux PCBs, permettant de mieux cerner le risque pour le développement du SNC, du nouveau-né. Ce projet visait à la mise point de méthodes permettant de mesurer l'effet des PCBs sur l'expression de gènes cibles dans un modèle animal, et de disposer ainsi d'un modèle prédictif de la neurotoxicité de ces substances.

Le rat en développement a servi de modèle expérimental. Les mères gestantes ont reçu quotidiennement diverses doses de PCBs, jusqu'à quelques jours après la naissance. L'analyse a porté sur plusieurs tissus et organes prélevés chez le nouveau né durant cette même période.

A l'aide de méthodes de biologie moléculaire adaptées à la mise en évidence simultanée de variations d'expression, entre deux tissus, de plusieurs gènes, nous avons pu identifier un certain nombre d'entre eux dont l'expression est modulée par les PCBs. Ces variations entre tissus traités ou non ont été trouvées dans divers tissus en développement, dont le cerveau.

Cependant, les pourcentages de variation observés ne permettent pas d'étudier l'effet dose-réponse des PCBs sur l'expression de ces gènes par des techniques moléculaires de mesure à grande échelle. Cette approche a conduit à l'isolement de deux gènes cérébraux, encore inconnus chez le rat, dont l'expression néonatale est altérée par les biphényles polychlorés. L'analyse est actuellement étendue à d'autres gènes cibles des PCBs.

Effet à long terme d'une exposition maternelle au plomb sur le développement psychomoteur ultérieur de l'enfant et de l'adolescent

Guy Huel et al., 1996

Les effets néfastes du plomb, chez l'être humain, sont connus depuis longtemps. L'importance de la dissémination de ce métal dans l'environnement et les graves conséquences sur la santé qui en découlent ont entraîné les instances sanitaires nationales et internationales vers une politique d'éradication. Les enfants semblent particulièrement sensibles aux effets du plomb.

Les propriétés toxiques du plomb, lors d'exposition aiguës ou chroniques, sont bien connues notamment sur le système hématopoïétique, sur le système nerveux central et sur la reproduction. Lors d'exposition à doses "environnementales", c'est-à-dire a priori modérées, les études épidémiologiques montrent de façon quasi unanime un effet sur le cours de la grossesse, le développement staturo-pondéral du fœtus et psychomoteur de l'enfant. Si ces effets ne font plus de doute à l'échelle épidémiologique, les mécanismes par lesquels le plomb induit l'effet nocif sur le système nerveux central du fœtus et du jeune enfant sont actuellement inconnus.

Parmi les nombreuses hypothèses plausibles l'une concerne l'intervention du plomb sur l'inhibition d'une famille d'enzyme (ATPase) impliquée dans le transport au travers de la membrane cellulaire de certains ions (Na⁺K⁺ et Ca⁺).

Ce travail confirme que l'effet d'une exposition au plomb sur le développement psychomoteur ultérieur de l'enfant pourrait être expliqué en partie par l'inhibition partielle de ces transports ioniques membranaires. Ces étapes sont fondamentales dans la transmission du potentiel d'action le long de l'axone qui conduit l'information entre cellules neuronales. L'intervention d'une autre enzyme (ALA-D) pourrait intervenir dans ce mécanisme complexe.

Plusieurs études expérimentales ont suggéré que certains troubles comportementaux pourraient être attribués à des altérations de certains paramètres des fonctions monoaminergiques (impliquant un type de neurotransmetteurs). Peu d'observations chez l'homme ont été réalisées. Nous avons montré que l'effet du plomb sur la sociabilité de l'enfant était partiellement expliqué par le système sérotoninergique.

Du point de vue général, les résultats de cette recherche ne montrent pas de lien significatif entre l'exposition au plomb à la naissance et les performances cognitives et motrices à 17 ans. En première analyse nous pouvons interpréter ce résultat comme la preuve d'une certaine réversibilité apparente des effets neurotoxiques de l'exposition in utero au plomb. Cependant les performances mnésiques paraissent continuées d'être affectées après l'adolescence.

Publications issues de ce projet

Yang HW, Huel G, Campagna D, Hellier G, Boissinot C, Blot P. Neurodevelopmental evaluation of 9-month-old infants exposed to low levels of lead in utero: involvement of monoamine neurotransmitters. J Appl Toxicol 1999;19(3):167-72.

Campagna D, Huel G, Girard F, Sahuquillo J, Blot P. Environmental lead exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. Toxicology 1999;134(2-3):143-52.

Campagna D, Huel G, Hellier G, Girard F, Sahuquillo J, Fagot-Campagna A, et al. Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns. Life Sci 2000;68(2):203-15.

Takser L, Dellatolas G, Bowler R, Laplante N, Huel G. Predictive factors of manual dexterity and cognitive performance at 17 years: a 10-year longitudinal study in a rural area of France. Percept Mot Skills 2002;95(1):15-26.

Huel G, Yazbeck C, Burnel D, Missy P, Kloppmann W. Environmental boron exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in a newborn population. Toxicol Sci 2004;80(2):304-9.

Conception et développement d'un test original, le FEGA (Foetal Gonad Assay) permettant de révéler et d'analyser les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement fœtal testiculaire

Bernard Jégou et al., 1998

De nombreux agents présents dans notre environnement sont connus pour être nocifs vis-à-vis de la fonction de reproduction mâle et il est frappant de constater que la résurgence du débat sur la détérioration séculaire de plusieurs paramètres de la reproduction masculine coïncide avec les préoccupations croissantes de la population sur la dégradation de l'environnement. Parmi tous les agents susceptibles d'affecter la fonction de reproduction chez le mâle, les xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme) font l'objet d'une attention particulière. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu approfondir nos connaissances sur l'effet des xénobiotiques, plus particulièrement l'effet des perturbateurs endocriniens qui miment des effets hormonaux, sur le développement du testicule fœtal.

Nous avons utilisé un système de culture organotypique de testicule fœtal de rat afin de rechercher les cibles cellulaires, moléculaires et fonctionnelles de deux hormones de synthèse : le diethylstilbestrol (DES) et l'œstradiol (E2). Au regard des différents comptages cellulaires et des dosages effectués, nous avons pu noter que les 3 types cellulaires testiculaires sont des cibles potentielles des xéno-œstrogènes et que les gonocytes sont les premières cellules atteintes et les plus altérées. Puis nous avons couplé ce système de culture à un logiciel de stéréologie qui permet d'effectuer le comptage accéléré des cellules du testicule fœtal. Plus rapide d'utilisation, ce logiciel nous a permis de valider l'ensemble du test FEGA en étudiant les effets cellulaires et moléculaires du Bisphénol A (perturbateur endocrinien qui entre dans la composition d'emballages plastiques) sur les différentes cellules du testicule fœtal de rat. Ces travaux nous ont permis de bâtir un test robuste d'étude des effets des hormones et xéno-hormones sur la gonade fœtale et d'obtenir des résultats originaux concernant le mode d'action de certaines de ces substances.

Publications issues de ce projet

Lassurguere J, Livera G, Habert R, Jegou B. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. Toxicol Sci 2003;73(1):160-9.

Incidence d'une exposition in utero au bisphénol A sur l'organogenèse testiculaire

Brigitte Le Magueresse-Battistoni et al., 2000

En début de vie foetale, la gonade est dite indifférenciée. Dans les gonades mâles XY, la différenciation testiculaire démarre vers la mi-gestation chez les rongeurs. Très vite, la testostérone (hormone mâle) sera synthétisée, permettant la masculinisation du tractus urogénital et des organes sexuels secondaires. Récemment, il a été montré que certaines molécules présentes dans l'environnement étaient dotées de propriétés oestrogéniques (propre aux hormones sexuelles femelles) néfastes au développement de la fonction de reproduction chez le mâle.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au bisphénol A. Ce composé est largement utilisé dans l'industrie du plastique (ex tétines de biberon, canettes de boisson...) et en dentisterie. Or cette molécule mime les effets des œstrogènes. Nous avons donc étudié l'impact d'une exposition in utero au bisphénol A sur la différenciation testiculaire de la descendance mâle. Le travail a été réalisé chez la souris et la dose testée de bisphénol A est compatible avec une exposition environnementale.

Les résultats de cette étude confirment que le bisphénol A franchit la barrière foeto-placentaire. Pour autant, le déroulement de la gestation n'est pas perturbé. De même, le testicule se différencie correctement et les cellules germinales, qui transmettent le patrimoine génétique du père, ne sont pas touchées dans leur capacité à se multiplier ou à se différencier.

Ces conclusions contredisent les publications antérieures menées par Vom Saal et al (Toxicol Ind Health 1998). En revanche, nos résultats sont en accord avec une publication récente de la commission européenne (avril 2002, SCF/CS/PM/3936/ opinion of the Scientific Committee on Food on bisphenol A).

Publications issues de ce projet

Guyot R, Magre S, Leduque P, Le Magueresse-Battistoni B. Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) during mouse gonad development. Dev Dyn 2003;227(3):357-66.

Guyot R, Odet F, Leduque P, Forest MG, Magueresse-Battistoni BL. Diethylstilbestrol inhibits the expression of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse fetal testis. Mol Cell Endocrinol 2004;220(1-2):67-75.

Odet F, Guyot R, Leduque P, Le Magueresse-Battistoni B. Evidence for similar expression of protein C inhibitor and the urokinase-type plasminogen activator system during mouse testis development. Endocrinology 2004;145(3):1481-9.

Etude des potentiels oestrogénomimétiques de molécules issues d'emballages plastiques et comparaison avec les potentiels oestrogénomimétiques de flavonoïdes alimentaires chez le rat mâle et femelle afin d'évaluer les risques liés à ces différentes molécules

Jean-Claude Lhuguenot et al., 2000

Les contaminations de nos milieux de vie et de notre alimentation ne doivent pas être considérées de manière isolée, mais dans leur ensemble. Le cas des phtalates et des bis-phénols présents dans les emballages destinés au contact alimentaire et connus pour migrer dans ces aliments en est un exemple clair.

L'étude a été entreprise en vue d'aborder une évaluation du risque de ces molécules sur une base commune en terme de toxicité, qui pourra être complétée par une analyse des niveaux d'exposition relatifs à chacune de ces contaminations.

Ce projet a établi les potentiels oestrogénomimétique du butylbenzyl phtalate, du bisphénol A (molécules issues de l'emballage) et de l'apigénine (flavonoïde appartenant également à la famille des polyphénols mais provenant de notre alimentation).

Il apparaît que le potentiel oestrogénomimétique des phytoestrogènes (famille à laquelle appartient l'apigénine) est nettement plus élevé que celui observé pour les molécules issues des emballages. Par ailleurs, les niveaux d'exposition du consommateur aux phytoestrogènes sont beaucoup plus importants.

Enfin il a été démontré que ces potentiels oestrogénomimétiques font appel à des mécanismes différents selon les molécules considérées.

Ces résultats indiquent sans ambiguïté que le risque lié à ces molécules relève d'une approche différente sur le plan réglementaire en sécurité alimentaire et pour l'environnement général, même si la nature du danger semble identique.

Publications issues de ce projet

Picard K, Lhuguenot JC, Lavier-Canivenc MC, Chagnon MC. Estrogenic activity and metabolism of n-butyl benzyl phthalate in vitro: identification of the active molecule(s). *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;172(2):108-18.

Lassarguere J, Livera G, Habert R, Jegou B. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci* 2003;73(1):160-9.

Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol* 2003;17(4):421-32.

Stroheker T, Cabaton N, Berges R, Lamothe V, Lhuguenot JC, Chagnon MC. Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. *Food Chem Toxicol* 2003;41(8):1175-83.

Stroheker T, Picard K, Lhuguenot JC, Canivenc-Lavier MC, Chagnon MC. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2004;42(6):887-97.

Micropolluants des eaux à effet modulateur endocrinien : impact sur la formation osseuse et l'angiogénèse au cours du développement

Michèle Lieberherr et al., 2000

Le projet étant actuellement en cours de finalisation, le résumé des travaux réalisés dans le cadre de ce projet n'est pas disponible. Les premiers résultats sont néanmoins mentionnés dans la mise en perspective du thème *Reproduction, développement & environnement*.

Toxicité du plomb et fonction ovarienne

Véronique Machelon et al., 1997

Le plomb est un métal lourd dont la présence à des taux élevés dans l'environnement représente une menace pour la santé publique. Les risques d'intoxication aiguë ou chronique par ingestion ou par inhalation sont multiples : risques professionnels, risques liés à l'environnement (pollution par les déchets industriels, accumulation dans les végétaux et la viande animale), risques liés à la vétusté des habitations (tuyauteries, peintures au plomb).

Le plomb ingéré ou inhalé passe dans la circulation sanguine, il peut être fixé et accumulé (os et dents principalement), mais aussi être libéré et échangé à d'autres tissus. Le remodelage osseux, par exemple, induit une libération non contrôlable de plomb dans l'organisme ce qui rend plus difficile l'appréciation des risques, en particulier des effets retardés.

Dans les expositions à des niveaux élevés, les principaux organes touchés sont le système sanguin, le système nerveux et le système rénal, mais d'autres effets peuvent aussi se manifester au cours d'expositions à long terme et à bas niveaux. Les effets toxiques du plomb sur la reproduction et le développement sont connus depuis plusieurs dizaines d'années. La plupart des travaux ont porté sur le système reproducteur mâle en raison probablement des risques professionnels plus élevés chez les hommes. Cependant, les risques de saturnisme concernent aussi les femmes dont les conséquences peuvent se traduire par une diminution de la fertilité.

Le projet conduit ici visait à préciser les cibles sur l'appareil reproducteur de la femme de l'activité toxique du plomb et plus particulièrement sa toxicité directe sur les cellules ovariennes.

Le follicule ovarien a une double fonction, gamétogène en assurant la maturation complète puis l'émission de l'ovocyte, et endocrinienne en synthétisant les hormones stéroïdes essentielles à la fonction de reproduction. Pour évaluer les risques liés à des contaminations par le plomb, nous avons cherché à mettre en évidence les effets du plomb sur cinq protéines impliquées dans la maturation du follicule ovarien. Pour ce travail nous avons utilisé des cellules ovariennes humaines prélevées chez des femmes traitées en vue d'une fécondation in vitro (FIV) au

moment du recueil de l'ovocyte. Ces cellules ont été mises en culture au laboratoire en présence et en absence de plomb. En parallèle, sur des souris élevées au laboratoire, nous avons étudié les effets du plomb administré par voie intrapéritonéale sur la folliculogénèse ovarienne.

Les expériences réalisées sur les souris ont montré que le plomb s'accumule préférentiellement dans les os, mais on observe aussi une augmentation de la concentration en plomb dans les ovaires de souris intoxiquées. Les expériences réalisées in vitro sur les cellules humaines montrent que le plomb peut pénétrer dans les cellules ovariennes et modifier l'expression et les fonctions de protéines membranaires et cytoplasmiques.

Ces modifications peuvent être à l'origine d'une augmentation de l'atrésie folliculaire, processus qui entraîne la disparition des follicules ovariens avant leur stade de maturation terminale conduisant à la libération d'un ovocyte fécondable. Des perturbations de ce type peuvent induire une hypofertilité et des troubles des fonctions de la reproduction analogues à ceux précédemment décrits dans la littérature chez des femmes exposées au plomb, soit de façon aiguë soit de façon chronique (expositions à de faibles doses mais de façon répétée).

L'ensemble de ces résultats indique, comme cela avait été précédemment montré chez le mâle, que le plomb pourrait affecter la production hormonale et les effets médiés par les hormones. On peut donc le considérer comme un perturbateur endocrinien de l'environnement.

Publications issues de ce projet

Machelon V. Toxicité du plomb et fonctions ovariennes. *Reproduction Humaine et Hormones* 2000;XIII:552-557.

Taupeau C, Poupon J, Nome F, Lefevre B. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reprod Toxicol* 2001;15(4):385-91.

Taupeau C, Poupon J, Treton D, Brosse A, Richard Y, Machelon V. Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 2003;68(6):1982-8.

Taupeau C, Gaudin-Nome F, Lieberherr M, Machelon V. Lead (Pb2+) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) production in human post-LH ovarian granulosa cells and potentializes the estradiol effect on VEGF in the MCF-7 breast cancer cell line. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004;(sous presse) .

Exposition aux éthers de glycol et fertilité masculine

Luc Multigner et al., 1997

Les éthers de glycols sont des solvants oxygénés présents dans de nombreuses préparations à usage professionnel ou domestique : peintures, encres, vernis, produits d'entretien et de nettoyage, cosmétiques et mêmes dans certaines préparations pharmaceutiques. Il existe près d'une trentaine d'éthers de glycols différents répartis entre des dérivés de l'éthylène glycol et des dérivés du propylène glycol. De nombreuses études expérimentales chez l'animal ont montré que certains éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol tels que le méthyl glycol (EGME) ou l'éthyl glycol (EGEE) sont des toxiques de la reproduction chez le mâle.

Nous avons réalisé une étude épidémiologique destinée à étudier les conséquences éventuelles que pourraient entraîner les expositions professionnelles aux éthers de glycol sur la fertilité masculine. Cette étude a été réalisée parmi des agents de la Ville de Paris et s'est accompagnée d'une évaluation des niveaux actuels d'exposition aux éthers de glycol.

Les expositions aux éthers de glycol sur la période 1990 – 2000 ont été évaluées par questionnaire et par l'examen détaillé de la composition de quelques 700 produits chimiques. Les dosages des métabolites urinaires, mesurant les expositions récentes, ont été réalisés en fin de poste de travail hebdomadaire.

La fertilité, capacité biologique à se reproduire, a été évaluée par l'examen des caractéristiques du sperme et par la mesure de certaines hormones indispensables à la reproduction. Les relations entre fertilité et expositions aux éthers de glycol ont été étudiées en fonction des expositions actuelles (mesurées par les métabolites urinaires) ou des expositions passées (période 1990-2000) en tenant compte des produits employés et de la fréquence et du nombre d'années d'utilisation.

Les résultats obtenus montrent que les métabolites de l'EGME, de l'EGEE et de l'EGBE sont à des concentrations 100 à 1000 fois inférieures à celles observées en France au début des années 1990 chez des salariés professionnellement exposés aux éthers de glycol.

Aucune association significative n'a été mise en évidence entre les niveaux actuels d'expositions aux éthers de glycol et les caractéristiques du sperme ou les niveaux d'hormones. Cependant, les hommes qui ont été dans le passé en contact régulier à des produits contenant des éthers de glycol, possèdent certaines caractéristiques du sperme de moins bonne qualité que les hommes n'ayant pas été en contact avec ces produits. Il s'agit du nombre de spermatozoïdes et du pourcentage de formes normales de spermatozoïdes qui sont diminués alors que d'autres paramètres tels que la mobilité ou la vitalité des spermatozoïdes restent inchangés. Concernant les hormones, et à l'exception d'une légère augmentation de l'une d'entre elle mais dans les limites de la normalité (FSH), aucune différence n'a été observée entre les hommes exposés et les non exposés.

Il est à noter que les valeurs moyennes des caractéristiques du sperme et des hormones, y compris chez ceux qui ont été exposés par le passé à des produits contenant des éthers de glycol, se situent dans les limites de la normalité. Les résultats témoignent, très vraisemblablement, d'effets résiduels d'expositions à une période où les éthers de glycol toxiques pour la reproduction étaient fréquemment présents dans des produits chimiques. Il est admis que, sauf pour des fortes expositions, les effets testiculaires des éthers de glycol sont réversibles dans le temps à condition que l'exposition cesse.

Bien que l'estimation rétrospective des expositions à des produits contenant des éthers de glycol ne permette pas de prendre en compte le rôle éventuel des autres solvants qui les accompagnent (et dont leur toxicité est souvent mal ou pas connue), l'ensemble des résultats observés est cohérent avec ce qui est connu de la toxicité expérimentale des éthers de glycol toxiques pour la reproduction.

Dans le cadre de ce projet, une amélioration substantielle de la sensibilité des dosages urinaires des métabolites des éthers de glycol a été obtenue. Cette méthodologie peut dorénavant être employée dans le cadre de la surveillance des expositions en milieu professionnel.

Publications issues de ce projet

Ben-Brik E, Jerome L, Arnaud I, Yous S, Labat L, Haguenoer JM, et al. Exposure to glycol ethers in a population of French men evaluated by measurement of urinary alkoxy-carboxylic acids. *Int Arch Occup Environ Health* 2004;77(5):368-72.

Impact des pollutions environnementales sur la reproduction de la faune sauvage

Luc Multigner et al., 1999

De nombreuses observations suggèrent que des facteurs environnementaux de nature chimique et générés par l'activité humaine ont un effet délétère sur la fonction de reproduction.

Au cours des dernières décennies, diverses modifications séculaires de la fonction de reproduction, en particulier chez le mâle, ont été rapportées : atteinte de la spermatogenèse ou anomalies du développement de l'appareil génital chez des vertébrés mâles (reptiles, poissons, oiseaux, mammifères). Plusieurs hypothèses pour expliquer ces phénomènes ont été évoquées. L'une d'entre elles est que des substances chimiques générées par l'activité humaine et répandues dans l'environnement pourraient se comporter comme des « perturbateurs endocriniens » en mimant ou en inhibant les effets de certaines hormones. Dans certaines circonstances il est possible de réaliser des études contrôlées auprès de populations animales domestiques ou sauvages. Les informations ainsi obtenues peuvent apporter de la cohérence aux études expérimentales et mieux orienter les études à venir.

Le projet ORCHIDEE a été mis en place pour évaluer l'impact des pollutions environnementales sur la fonction de reproduction des mammifères sauvages. Cette étude s'est déroulée en Guadeloupe profitant des caractéristiques environnementales tout à fait particulières de ce département. La Guadeloupe se caractérise par une utilisation intense de pesticides liée aux activités agricoles (culture de la banane, canne à sucre) entraînant une pollution des milieux naturels. Par ailleurs des écosystèmes vierges de toute pollution directe d'origine humaine coexistent avec des zones agricoles polluées. L'objectif du projet était d'étudier et de comparer, chez des mammifères inféodés à des biotopes pollués et chez des mammifères inféodés à des biotopes dépourvus de toute pollution directe, la fonction de reproduction.

En collaboration avec l'Office National de la Chasse et le Parc National de la Guadeloupe, 210 mammifères (Rat noir, Rat surmulot, Souris domestique et Mangouste) ont été capturés dans 4 écosystèmes : 2 agro systèmes consacrés à la culture bananière et à la canne à sucre et 2 écosystèmes « naturels » caractérisés par une forêt tropicale humide en altitude et une forêt sèche côtière sur îlet. Le nombre d'animaux capturés nous a obligé à restreindre les analyses et seul les rats noirs mâles capturés sur trois sites (culture bananière, forêt tropicale humide et forêt sèche côtière) ont été étudiés.

Les animaux issus de la forêt tropicale humide présentent des caractéristiques particulières. Tout en ayant un âge relatif similaire aux animaux capturés dans l'agrosystème bananier ou dans la forêt sèche côtière, ils présentaient un poids corporel et des caractéristiques reproductives d'animaux sub-adultes n'ayant pas atteint leur maturité sexuelle. Ceci semble s'expliquer par les faibles ressources alimentaires de la forêt tropicale humide. Dans ces conditions, les animaux issus de la forêt tropicale humide ne constituent pas un bon groupe témoin lorsqu'on veut les comparer à un groupe d'animaux issus d'un écosystème pollué.

Les animaux capturés dans les bananeraies présentent des poids relatifs (poids rapporté au poids de l'animal), des organes génitaux et des niveaux de testostérone plus faibles que ceux des animaux de même âge issus de la forêt sèche côtière sur îlot.

Ces résultats suggèrent une influence délétère des facteurs environnementaux (par exemple pollution par les pesticides employés en bananeraies) sur la fonction de

reproduction. Cependant, ces relations sont bien plus complexes étant donnée l'influence majeure des ressources nutritionnelles sur la fonction de reproduction.

Publications issues de ce projet

Bazire A, Schorvaert D, Jouannet P, Multigner L, Auger J. Caractéristiques de morphologie et de mouvements de spermatozoïdes de *Rattus rattus* provenant de trois écosystèmes guadeloupéens : impact probable des pollutions environnementales. *Andrologie* 2000;12:383-384.

Interaction des xénobiotiques avec la protéine de liaison des stéroïdes sexuels (SBP/SHBG)

Conséquences sur leur biodisponibilité in vivo

Michel Pugeat et al., 1997

L'hypothèse selon laquelle la contamination de notre environnement par des produits toxiques peut gravement nuire à notre santé a été vérifiée à l'occasion d'accidents dramatiques de pollution. La question d'une contamination permanente de notre environnement qui dépasserait nos capacités d'adaptation a fait l'objet de nombreuses hypothèses non vérifiées.

La mise en place de moyens innovants permettant la détection de contaminants et l'étude de leur devenir dans l'organisme (accumulation dans les différents tissus, processus d'élimination,...) constitue un préalable indispensable à l'évaluation des risques sanitaires liés à ces substances.

Ce projet s'est intéressé au bisphénol A, composant majeur du plastique très largement utilisé dans les emballages (eau et aliments). Ce produit étranger dont les effets miment ceux des hormones féminines (xénoestrogène), pourrait être un dérégulateur du système endocrinien. Comme les estrogènes naturels, après ingestion, il est transporté dans le sang par une protéine de transport des hormones stéroïdes sexuelles ou SHBG (sex hormone-binding globulin), qui va limiter sa diffusion dans les organes nobles et faciliter son métabolisme avant d'être éliminé.

Ce système n'existe pas chez les rongeurs habituellement utilisés comme animaux de laboratoire dans les tests toxicologiques. Nous avons donc utilisé le modèle d'une souris, qui reçoit de la SHBG humaine purifiée pour étudier spécifiquement l'interaction de cette protéine avec le bisphénol A et son rôle dans le devenir de la molécule dans l'organisme.

Nous avons pu montrer en utilisant du bisphénol A marqué par un traceur d'iode radioactive que cette protéine de transport limitait la diffusion du bisphénol A dans le foie et les testicules, comme elle le fait pour les hormones stéroïdes endogènes.

Dans le cadre de cette étude, nous avons développé un réactif (ici un anticorps) pour le dosage du bisphénol A dans le sérum de sujets normaux et de patients présentant une anomalie du développement ou des troubles de la reproduction.

Ces résultats contribuent à l'évaluation des risques pour la santé humaine des contaminations liées à notre environnement et contribuent à la prise de décision en terme de mesures de sécurité qui s'imposent pour la protection de la santé humaine.

Publications scientifiques issues de ce projet

Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perrière AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 1999;64(5):328-34.b

Bendridi N, LeJeune H, Pugeat M. La fécondité masculine serait-elle menacée par l'environnement ? Rôle potentiel des xénoestrogènes. *Rev Franç Endocrin Clin* 1999;XL.

Bendridi N, Mappus E, Cuilleron C, Grenot C, Pugeat M. Interaction du bisphenol A avec la sex hormone-binding globulin (SHBG) : conséquences sur sa biodisponibilité in vivo. *Ann Endocrin* 2000;4:362.

Bendridi N, LeJeune H, Pugeat M. Xénobiotiques et altération de la fonction de reproduction chez l'homme. *Métabolimes-Hormones-Nutrition* 2001;V(6):281-285.

Bendridi N, Mappus E, Grenot C, Lejeune H, Yves Cuilleron C, Pugeat M. Intravenous injection of human sex steroid hormone-binding globulin in mouse decreases blood clearance rate and testicular accumulation of orally administered 125Iiodobisphenol A. *Steroids* 2002;67(7):637-45