

## Fertilité féminine et xénobiotiques

## Impact des phtalates et des composés perfluorés

Période : avril 2009 à août 2009

Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI

Université de médecine Lyon 1 – Inserm U870/INRA 1235 – Oullins

Mots clés : Composés perfluorés, Culture cellulaire, Étude épidémiologique, Perturbateur endocrinien, phtalates, Qualité spermatique

Un faisceau croissant d'indications suggère l'existence de liens entre les altérations du développement sexuel, de la qualité du sperme et des fonctions hormonales, observées dans diverses régions du monde et dans différents secteurs d'activité et l'exposition à certains agents chimiques pendant la vie post-natale et/ou pendant la vie fœtale. Dans cette note d'actualité scientifique, nous présentons deux familles de polluants : les composés perfluorés<sup>(1)</sup> et les Phtalates. Pour les composés perfluorés, il s'agit d'une étude épidémiologique sur la qualité du sperme humain d'hommes jeunes non exposés professionnellement en relation avec les taux plasmatiques des composés perfluorés ; tandis que pour les Phtalates, la sélection des deux articles repose davantage sur la description de modèles *in vitro* d'étude que sur la caractérisation des effets reprotoxiques.

## Impact des composés perfluorés sur la qualité du sperme humain

## Analyse

Dans cette publication, Joensen *et al.* (2009) posent l'hypothèse d'une corrélation entre les niveaux de testostérone circulants, la qualité spermatique et la concentration circulante des composés perfluorés chez l'homme. Précisément, 10 composés perfluorés sont dosés dans le sérum de 105 hommes jeunes danois (âge médian : 19 ans) choisis dans une cohorte de 546 hommes recensés pour le service militaire en 2003 d'après leurs niveaux de testostérone<sup>(2)</sup> circulants. Le groupe 1 est constitué de 53 hommes présentant des niveaux de testostérone circulants élevés (médiane de 31,8 nmol/L ; 30,1 à 34,8 nmol/L) et le groupe 2 de 52 hommes présentant des niveaux bas (médiane de 14 nmol/L ; 10,5 à 15,5 nmol/L).

Sept composés perfluorés étant présents à des concentrations très faibles, l'étude porte essentiellement sur deux des trois composés perfluorés majoritairement retrouvés dans le sérum des 105 hommes : les PFOS et PFOA. Les hommes présentant les plus fortes concentrations des composés PFOS et PFOA ont un nombre médian de spermatozoïdes de morphologie normale significativement inférieur aux valeurs retrouvées chez les hommes présentant les plus faibles concentrations de ces 2 mêmes composés (6,2 versus 15,5 millions de spermatozoïdes). Cependant, aucune association statistiquement significative n'a été observée avec les autres paramètres de qualité du sperme (volume des éjaculats, concentration de spermatozoïdes<sup>(3)</sup>, motilité) ou avec les concentrations circulantes des hormones de la reproduction (hormones sexuelles : testostérone, œstradiol<sup>(4)</sup>, SHBG<sup>(5)</sup>, inhibine B6, hormones hypophysaires FSH et LH7).

Le tabagisme et l'indice de masse corporelle<sup>8</sup> des participants n'étaient associés ni aux concentrations circulantes de composés perfluorés ni à la qualité du sperme.

## Commentaire

Les composés perfluorés sont apparus comme une classe importante de polluants persistants dans notre écosystème dans les années 2000 suite aux pressions de l'Agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) à l'égard de l'entreprise 3M, premier producteur mondial de ces composés. De ce fait, la connaissance des dangers liés à ces composés provient essentiellement des études menées chez les travailleurs de 3M. L'étude de Joensen *et al.* (2009) est à cet égard originale puisque la cohorte étudiée est constituée d'hommes jeunes et non de travailleurs exposés. Les résultats sont donc représentatifs du niveau de contamination d'une population générale. La mise en évidence d'une corrélation inverse entre la teneur plasmatique de ces composés et le nombre de spermatozoïdes de morphologie normale suggère que ces composés sont à rajouter à la liste des perturbateurs endocriniens dont on pense qu'ils sont impliqués dans la baisse progressive de la fertilité masculine observée dans plusieurs régions industrialisées. Les résultats de cette étude nécessitent cependant d'être confirmés dans une étude plus large incluant des hommes sans préjuger de leur fertilité ou de leurs fonctions hormonales. En effet, dans cette étude, le recrutement exclusif d'hommes ayant des concentrations sériques de testostérone élevées ou basses a pu introduire des biais ou des facteurs de confusion gênant l'interprétation des résultats observés.

## Impact des phtalates et des composés perfluorés

Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI

### Effets temps et dose- dépendants du Di-(2-ethylhexyl) Phtalate et de ses métabolites sur la fonction testiculaire du fœtus de rat : approche *in vitro*

#### Analyse

Les effets de type « perturbateurs endocriniens » des Phtalates DHEP et MEHP<sup>(9)</sup> sur la fonction testiculaire ont surtout été documentés *in vivo*. Ainsi, la cellule de Leydig<sup>(10)</sup> est une cible assez bien caractérisée chez le rongeur et un modèle d'exposition anténatale du rat aux Phtalates a été proposé pour aider à la compréhension du syndrome de dysgénésie testiculaire<sup>(11)</sup> (Fisher *et al.*, 2003). Plus récemment, Lambrot *et al.* (2009) démontraient que les cellules germinales<sup>(12)</sup> du testicule fœtal humain mais pas la production de testostérone, sont une cible du MEHP dans un modèle de culture organotypique<sup>(13)</sup>. Dans cette étude, **Chauvigné *et al.* (2009)** utilisent un modèle de culture organotypique pour décrypter plus avant les effets délétères des Phtalates dans un modèle rat. En particulier, ces auteurs démontrent que le métabolite principal MEHP, mais pas le produit mère, altère la fonction de la cellule de Leydig (baisse de l'activité stéroïdogène et localisation ectopique de quelques cellules de Leydig mais maintien de la capacité à répondre à l'hormone trophique), mais aussi la cellule de Sertoli<sup>(14)</sup> (maintien de leur nombre mais baisse de la production de l'hormone anti-müllérienne<sup>(15)</sup>) et les cellules germinales (baisse de l'activité de prolifération et augmentation de l'apoptose<sup>(16)</sup>). Les testicules sont prélevés sur des fœtus de 14,5 jours (jour 0 = bouchon vaginal) et l'exposition aux Phtalates se fait 3 jours durant soit pendant la fenêtre de sensibilité à l'action des perturbateurs endocriniens définie par Welsh *et al.* (2008).

#### Commentaire

Ce travail démontrant que les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales de testicules de fœtus de rats sont des cibles avérées du métabolite mais pas du produit mère valide le modèle de culture organotypique pour l'étude d'autres perturbateurs endocriniens dont on aura identifié les métabolites principaux. De surcroît, il devient alors possible *in vitro* d'avoir une démarche causale et d'identifier si l'atteinte d'un type cellulaire est un événement premier ou bien la conséquence d'un événement antérieur sur un autre type cellulaire. Ces travaux couplés à une analyse transcriptomique pourraient alors contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'action initiés par le MEHP. Cependant, comme les approches *in vivo* n'ont pas révélé d'atteintes au niveau des cellules germinales ou des cellules de Sertoli, cela pourrait aussi signifier qu'*in vivo* le MEHP n'atteint pas directement ces cellules (ou en quantité trop faible ; il a en effet été montré un possible passage de la barrière hémato-testiculaire par les phtalates dans les testicules adultes) tandis que le contact pour la cellule de Leydig s'effectuerait *via* la circulation sanguine.

### Optimisation du modèle de coculture cellule de Sertoli-gonocyte pour l'utilisation en reprotoxicité

#### Analyse

Dans l'étude de Yu *et al.* (2009), il s'agit de développer un modèle de coculture Sertoli-gonocyte<sup>(17)</sup> permettant d'identifier les produits reprotoxiques et de caractériser leurs mécanismes d'action. Brièvement après une dispersion enzymatique des testicules néonataux, une suspension cellulaire constituée essentiellement des cellules de Sertoli et des gonocytes a été obtenue ; une quantité ajustée de cette suspension a été étalée dans des chambres de culture en présence d'un milieu dépourvu en facteurs de croissance mais contenant des protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, laminine...). Il se forme, alors dans les chambres de culture, un système 3-D propice à la survie et au développement cellulaire. Dans ce modèle, les auteurs ont testé l'effet de différentes concentrations de 7 phtalates : 4 identifiés comme reprotoxiques (phtalates de dibutyle (DBP), diéthylhexyle (DEHP), dipentyle (DPP) et butylbenzyle (BBP)) et 3 identifiés comme sans effet reprotoxique (phtalates de diméthyle (DMP), diéthyle (DEP) et tere-phtalate de dioctyle (DOTP)). L'examen de la viabilité, de l'aspect morphologique et la cytotoxicité cellulaire confirme la reprotoxicité ou la non-reprotoxicité de ces 7 composés. Les auteurs ont ensuite réalisé un transcriptome afin d'identifier dans les différentes conditions le nombre de gènes impactés par la présence des polluants, l'effet dose-réponse, les regroupements hiérarchiques et les voies de signalisation empruntées. Dans le cas de phtalates reprotoxiques, 391 gènes ont été identifiés relevant du cycle cellulaire, de l'apoptose. Les auteurs ont également mis en évidence dans leur analyse transcriptomique une altération de l'expression de certains gènes de la stéroïdogenèse dans les cocultures traitées avec les phtalates reprotoxiques.

#### Commentaire

Les auteurs indiquent que leur modèle *in vitro* est une coculture de cellules de Sertoli et de gonocytes. L'observation d'une altération de l'expression de gènes de la stéroïdogenèse dans les cultures traitées avec les phtalates reprotoxiques valide le modèle parce qu'il suggère la survie et la différenciation des cellules de Leydig dans les cultures contrôles. Cependant, il soulève un aspect non abordé dans le papier et qui concerne le pourcentage des types cellulaires présents dans la suspension initiale et après les 24 heures de traitement par les phtalates. La répartition relative des cellules germinales, cellules de Sertoli et cellules de Leydig, est une donnée essentielle à l'interprétation des résultats de l'analyse transcriptomique.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La majorité des connaissances sur l'impact des composés perfluorés provient des études réalisées chez les travailleurs de l'entreprise 3M. L'exposition de la population générale à ces composés est moins bien connue. Ces agents sont présents dans une myriade de produits allant des emballages alimentaires aux mousses ignifuges, nettoyants ménagers et shampoings. Or, les données expérimentales manquent pour estimer l'exposition et *in fine*, le risque potentiel pour la santé humaine. Il est donc important que des études épidémiologiques soient conduites en population générale d'autant que ces composés passent la barrière sang-cerveau et que des taux ont été retrouvés dans le sang du cordon ombilical.

La question des phtalates se pose différemment, en particulier pour le DEHP et son métabolite principal, le MEHP étiquetés de reprotoxiques. Il s'agit en effet maintenant d'identifier les mécanismes de leur action anti-androgénique. Certainement, le modèle *in vitro*, que ce soit la coculture ou la culture organotypique, couplé à des analyses transcriptomiques devrait permettre de caractériser les grandes voies de signalisation empruntées par ces molécules avec à la clef l'identification de gènes cibles qui pourraient dans une version optimiste s'avérer de bons marqueurs d'exposition aux phtalates. Par ailleurs, la validation de modèles *in vitro* d'étude de la reprotoxicité de polluants devrait permettre de cribler un grand nombre de polluants de façon plus systématique et moins onéreuse que l'expérimentation *in vivo*. Or, la directive REACH impose aux industriels de prouver l'innocuité des substances chimiques qu'ils fabriquent. Et même si des critères d'exclusion ont été déterminés sur la base du tonnage de production, pas loin de 70 000 substances chimiques sont à évaluer.

## Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Endocrine disrupters and testis, Male reproductive health, Male reproductive toxicity, Testicular dysgenesis syndrome

## Publications analysées

**Chauvigné F, Menuet A, Lesné L et al.** 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(4):515-21.

**Joensen UN, Bossi R, Leffers H et al.** Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? Environ. Health Perspect. 2009; 117(6):923-7.

**Yu X, Hong S, Moreira EG et al.** Improving *in vitro* Sertoli cell/gonocyte co-culture model for assessing male reproductive toxicity: Lessons learned from comparisons of cytotoxicity versus genomic responses to phthalates. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009; 239(3):325-36.

## Publications de référence

**Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N et al.** Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. Hum. Reprod. 2003; 18(7):1383-94.

**Lambrot R, Muczynski V, Lécureuil C et al.** Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis *in vitro* without change in testosterone production. Environ. Health Perspect. 2009; 117(1):32-7.

**Welsh M, Saunders PTK, Fisk M et al.** Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. J. Clin. Invest. 2008; 118(4):1479-90.

## Publications non sélectionnées

**Martin MT, Mendez E, Corum DG et al.** Profiling the reproductive toxicity of chemicals from multigeneration studies in the toxicity reference database. Toxicol. Sci. 2009; 110(1):181-90.

*Le travail présenté s'inscrit dans la volonté de développer des outils informatiques de prédiction toxicologique afin de prédire in silico et à grande échelle l'impact toxicologique de milliers de produits chimiques. Les auteurs proposent une base de données baptisée ToxRefDB construite à partir des données expérimentales de 329 études multi-génération menées chez le rat testant 316 molécules chimiques. Les critiques de ce travail nécessitent des compétences en informatique et statistique que l'expert ne possède pas.*

**Meeker JD, Barr DB, Hauser R.** Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. Reprod. Toxicol. 2009; 27(2):155-60.

*Dans ce travail, les auteurs ont recherché l'existence de corrélations significatives entre les taux urinaires des insecticides synthétiques de type pyrethroid, insecticides les plus couramment utilisés aujourd'hui depuis l'interdiction de l'utilisation des insecticides organophosphorés et les concentrations hormonales sériques des hormones hypophysaires LH et FSH, de l'inhibine B, de la testostérone, de l'oestradiol et des hormones thyroïdiennes et de la SHBG. Une corrélation positive significative est détectée avec les taux de FSH et LH, à l'inverse avec l'inhibine B et la testostérone. C'est donc un produit qui mérite que l'on examine avec attention ses mécanismes d'action.*

**Saillenfait AM, Sabaté 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(4):468-76.

*L'objectif de ce travail était de comparer l'impact du di-n-hexyl phthalate à celui du DEHP bien établi sur la fonction de reproduction du rat. Les auteurs démontrent des effets similaires pour des doses d'exposition comparables. L'originalité du travail*

## Impact des phtalates et des composés perfluorés

Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI

*réside dans le concept de multi-exposition et d'additivité de l'effet des polluants. C'est la justification du commentaire de cet article dans cette note d'actualité scientifique.*

**Struve MF, Gaido KW, Hensley JB et al.** 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(4):345-54.

*L'objectif de ce travail était de comparer l'impact d'un gavage versus l'introduction dans la nourriture des polluants à tester (ici le dibutylphthalate). La fonction des cellules de Leydig a été le paramètre suivi dans les testicules des rats exposés in utero des jours 12 à 19 de la gestation et sacrifiés au 20<sup>e</sup> jour de gestation. Les auteurs démontrent des effets comparables entre les 2 modes d'administration. Le reste du travail n'a pas d'originalité.*

## Lexique

- (1) Composé perfluoré: les composés perfluorés sont utilisés comme antiadhésif, imperméabilisant et protecteur dans une multitude d'objets usuels. Ils ne se dégradent que très lentement, et sont présents dans l'eau, l'air, le sol et la plupart des organismes vivants. Ils sont considérés comme des perturbateurs endocriniens.
- (2) Testostérone: hormone stéroïde du groupe des androgènes produite par les cellules de Leydig stéroïdogènes dans le testicule des mammifères.
- (3) Liquide séminal et concentration de spermatozoïdes ou spermatique: le sperme est une combinaison de plusieurs fluides dans lequel les spermatozoïdes sont maintenus en vie pour une courte durée. La concentration spermatique est définie en millions de spermatozoïdes par ml.
- (4) Œstradiol ou œstrogènes: hormones sexuelles jouant un rôle dans la reproduction féminine mais aussi masculine ainsi que dans le développement du système nerveux central, dans l'homéostasie du squelette et du système cardio-vasculaire. Les œstrogènes ont également des effets sur le foie et le tissu adipeux.
- (5) SHBG pour Sex Hormone Binding Globulin: glycoprotéine qui se lie aux hormones sexuelles, en particulier testostérone et œstradiol. La biodisponibilité des hormones est donc contrôlée par les niveaux de SHBG.
- (6) Inhibin B: hormone peptidique principalement synthétisée par la cellule de Sertoli chez le mâle et qui inhibe au niveau de l'hypophyse, la synthèse de l'hormone FSH
- (7) Hormones hypophysaires FSH et LH: l'hormone folliculo-stimulante FSH et l'hormone lutéinisante LH sont des hormones gonadotropes de l'hypophyse; chez le mâle, FSH stimule l'activité des cellules de Sertoli; tandis que LH stimule l'activité des cellules de Leydig.
- (8) Indice de masse corporelle: cet indice se calcule en fonction de la taille et de la masse. Il permet d'estimer la corpulence d'une personne.
- (9) Phtalates DHEP et MEHP: les phtalates sont un groupe de produits chimiques apparentés du point de vue structural à l'acide organique connu sous le nom d'acide phtalique. Ils sont composés d'un noyau benzénique et de deux groupements carboxylates placés en ortho et dont la taille de la chaîne alkyle peut varier. Les phtalates sont couramment utilisés comme plastifiants des matières plastiques (en particulier du PVC pour former par exemple des plastisols) pour les rendre souples. Le MEHP ou mono-(2-ethylhexyl) phtalate (MEHP) est un métabolite du di-(2-ethylhexyl) phtalates (DEHP).
- (10) Cellules de Leydig: les cellules de Leydig sont localisées dans l'espace localisé entre les tubes séminifères (site de production des cellules germinales). Elles synthétisent la testostérone en réponse à l'hormone lutéinisante (LH).
- (11) Syndrome de dysgénésie testiculaire: il regroupe l'ensemble des désordres aujourd'hui observés et qui concernent la fonction de reproduction mâle, c'est-à-dire l'hypospadias, la cryptorchidie, la baisse des réserves spermatiques et les cancers du testicule. Ces manifestations sont en constante augmentation et les pays industrialisés sont les plus touchés. L'originalité de l'idée proposée par Niels Skakkebaek et aujourd'hui reconnue par la communauté scientifique, a été de poser comme postulat que l'exposition chronique ou au travail aux différents produits de l'environnement fabriqués par l'Homme souvent de façon non intentionnelle, induit tout ou partie de ces altérations de la fonction de reproduction.
- (12) Cellules germinales: cellule de la lignée germinale mâle ou femelle, s'oppose à cellule somatique. Il s'agit de toutes les cellules depuis les cellules fondatrices jusqu'au gamète, ovule ou spermatozoïde.
- (13) Culture organotypique: il s'agit de la culture de morceaux de tissus dans un milieu chimiquement défini. Ce système permet le maintien pendant plusieurs jours de l'architecture tissulaire. La difficulté réside dans le maintien d'une bonne oxygénation sur le moyen-terme.
- (14) Cellules de Sertoli: les cellules de sertoli sont les cellules de soutien à la lignée germinale tant sur un plan nutritif que sur un plan structural. En effet, elles sont le relais hormonal aux hormones trophiques, FSH et testostérone; elles s'étendent de la base jusqu'à l'apex du tube séminifère; elles établissent des contacts étroits avec les cellules de la lignée germinale aux différents stades de la spermatogenèse, les spermatogonies à la base et les cellules méiotiques et post-méiotiques vers l'apex.
- (15) Hormone anti-Müllérienne: hormone glycoprotéique synthétisée dans le testicule fœtal par les cellules de Sertoli. Son nom vient de son rôle essentiel dans la régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle.

- 16) Apoptose : mort cellulaire programmée, s'oppose à la notion de nécrose. La nécrose est la forme principale de mort d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe lors d'accidents traumatiques suite à certaines maladies ou lors de déficits métaboliques. Elle est généralement accompagnée d'une réponse inflammatoire. L'apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation. Dans le testicule, co-existent l'apoptose physiologique qui permet l'élimination des cellules défectueuses et la régulation du nombre de cellules germinales et l'apoptose provoquée par une agression extérieure comme une exposition à des polluants par exemple.
- (17) Gonocytes : les gonocytes sont les cellules germinales néonatales. Chez le rat, peu après la naissance, les gonocytes reprennent leur activité mitotique et migrent à la base du cordon tout en se différenciant en spermatogonies. Ces événements qui se déroulent à la base du cordon se déroulent dans un environnement appelé « niche » propice à la survie des cellules germinales souches. Une atteinte du nombre de gonocytes se traduira donc *in fine* par une baisse du nombre de spermatozoïdes produits.