

Effets endocriniens du fongicide vinclozoline et de deux retardateurs de flamme organophosphorés

Période : février 2010 à août 2010

Pierre CRETZAZ

Office fédéral de la santé public – Unité de protection des consommateurs – Berne, Suisse

Mots clés : Fertilité masculine, Méthylation de l'ADN, Perturbateurs endocriniens, Qualité du sperme, Retardateurs de flamme organophosphorés, Vinclozoline

Différents travaux ont indiqué dans les pays industrialisés une baisse de la concentration en spermatozoïdes, une augmentation des tumeurs testiculaires et des anomalies du système reproductif mâle telles que la cryptorchidie⁽¹⁾ et l'hypospadias⁽²⁾ (Carlsen *et al.*, 1992, Paulozzi *et al.*, 1999 et Andersson *et al.*, 2008). L'hypothèse a alors été faite que les perturbateurs endocriniens pourraient être impliqués dans la survenue de ces effets. Cette note explore cette hypothèse pour deux types de substances chimiques, la vinclozoline (un fongicide) et des retardateurs de flamme organophosphorés, en se basant respectivement sur un modèle animal et sur une étude épidémiologique.

Effet des perturbateurs endocriniens sur la fertilité masculine *via* la méthylation de l'ADN : étude de cas de la vinclozoline

Stouder C, Paoloni-Giacobino A. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reproduction*. 2010; 139: 373-379

Analyse

L'hypothèse a été émise que certains perturbateurs endocriniens pourraient induire leurs effets en agissant sur la méthylation de l'ADN⁽³⁾ (voir p.e. Marques *et al.*, 2010). On parle alors de changements épigénétiques⁽⁴⁾ ayant lieu à des sites spécifiques dénommés « domaines de méthylation différentielle »⁽⁵⁾ de certains gènes. La méthylation de l'ADN mène alors à une inactivation du gène concerné. Des études sur l'animal ont montré que la vinclozoline peut exercer des effets anti-androgènes et affecter la spermatogénèse en diminuant le nombre et la motilité des spermatozoïdes et en augmentant le nombre des formes anormales. Une des particularités des anomalies du sperme induites par la vinclozoline est qu'elles sont transgénérationnelles (chez la souris, on a montré qu'elles touchaient la génération exposée *in utero* et les trois suivantes). Un effet épigénétique, responsable de la transmission des anomalies de la lignée germinale masculine, a été évoqué et des travaux antérieurs ont montré des anomalies de la méthylation de fragments d'ADN du sperme des générations F1-F3, après exposition *in utero* à la vinclozoline de la génération F1.

La présente étude de Stouder et Giacobino (2010) a pour objectif d'étudier la possibilité d'un effet épigénétique de la vinclozoline *via* une perturbation de la méthylation. Pour ce faire, des souris ont été exposées à la vinclozoline (dose

d'exposition : 50 mg/kg ; période d'exposition : jours 10 à 18 de la gestation ; voie d'exposition : injection intrapéritonéale) ; les défauts de méthylation sur les domaines de méthylation différentielle de cinq gènes soumis à l'empreinte génomique⁽⁶⁾ (H19, Gtl2, Peg1, Snrpn et Peg3) ont alors été recherchés dans l'ADN des spermatozoïdes ainsi que de différents tissus (foie, queue et muscles squelettiques) des descendants mâles des trois premières générations (F1-F3 ; âge des descendants lors de l'analyse : 2 mois).

Il est apparu que la vinclozoline pouvait causer des altérations importantes de méthylation de l'ADN du sperme des descendants de la première génération F1. Des anomalies de la méthylation étaient toujours présentes dans l'ADN du sperme des descendants de la deuxième génération (F2), mais dans une moindre mesure que dans la génération 1. Il n'en a pas été détecté dans la troisième génération (F3) pour les gènes Gtl2, Peg1 et Snrpn, et elles étaient nettement moins marquées dans F3 que dans F2 pour les gènes H19 et Peg3. Cela indique une réversibilité des effets sur la méthylation de l'ADN. Un croisement des mâles F1, avec une femelle non exposée à la vinclozoline, donnait naissance à des mâles (F2) dont la méthylation de l'ADN du sperme n'était pas différente de ce qui était observé chez les témoins.

La possibilité que les changements de méthylation puissent avoir des conséquences biologiques a été testée. Il est apparu que la concentration moyenne de spermatozoïdes était, comparativement au groupe témoin, de 56 % dans la génération F1, de 90 % dans la génération F2 et de 100 % dans la génération F3. Une normalisation de la concentration en spermatozoïdes a donc lieu dès la deuxième génération.

Une discordance apparaît, de ce fait, entre l'effet de la vinclozoline sur la méthylation des gènes des cellules germinales (qui persiste sur trois générations) et les effets sur le

spermogramme (qui disparaissent dès la deuxième génération). Mais cela ne signifie pas que la diminution de la concentration de spermatozoïdes ne soit pas liée au statut de méthylation des gènes soumis à l'empreinte génomique, et il n'est pas exclu que les changements de méthylation rapportés dans cette étude aient des conséquences biologiques. Ainsi, il est possible qu'une baisse de la concentration en spermatozoïdes n'apparaisse qu'à partir d'un certain seuil d'altération de la méthylation de l'ADN. Les mesures dans la première génération F1 sur les cellules somatiques ont indiqué une modification de la méthylation pour le gène *Snrpn* dans les 3 tissus étudiés, ainsi que du gène *H19* dans la queue. Les anomalies de méthylation de l'ADN rapportées dans tous les types de cellules somatiques pour le gène *Snrpn* et uniquement dans la génération F1 indiquent vraisemblablement un effet toxique direct lors de l'exposition *in utero*. Par contre, des anomalies sur le gène *Peg3* ont été déterminées dans toutes les cellules somatiques pour les générations F2 et F3 et sont probablement transmises par cellules germinales. Il s'agit donc d'un mécanisme de type « épimutation », transmissible par la lignée germinale, mais pouvant, à la différence d'une mutation, être une anomalie réversible. On peut également envisager le fait que lors de l'exposition *in utero*, les gamètes déjà présents dans l'embryon exposé subissent une modification de la méthylation, ce qui reviendrait à un effet direct et non transgénérationnel. Avec cette hypothèse, il s'avérerait que seule la modification de la génération F3 serait un effet transgénérationnel.

Commentaire

Les mécanismes classiques d'action des perturbateurs endocriniens sont leurs effets agonistes ou antagonistes sur les récepteurs hormonaux. Cet article explore un mode d'action moins étudié des perturbateurs endocriniens, à savoir leurs effets sur la méthylation de l'ADN pouvant amener à des changements dans l'expression des gènes et à une perturbation de la spermatogénèse. L'étude de Stouder et Giacobino (2010) indique que les défauts épigénétiques induits par l'exposition *in utero* à un perturbateur endocrinien peuvent se transmettre de génération en génération (avec une méthylation de moins en moins importante en F2 et F3 par rapport à F1) et se maintenir au-delà de la reprogrammation transgénérationnelle de la méthylation de l'ADN. L'examen d'autres perturbateurs endocriniens (par exemple le bisphénol A et certains phtalates), d'autres conditions d'exposition (autres voies, autres périodes et autres doses), d'autres modèles animaux et d'autres gènes soumis à l'empreinte génomique sont des pistes à suivre pour continuer de tester l'hypothèse que les effets de certains perturbateurs endocriniens sur la spermatogénèse peuvent passer par l'altération de la méthylation de l'ADN. Le lien entre les modifications de la méthylation dans les cellules germinales et la spermatogénèse est supposé mais n'est pas clairement démontré, et on ne peut exclure que les modifications de méthylation dans des cellules somatiques jouent également un rôle dans des voies biologiques liées à la reproduction. Il est possible que le fond génétique au sein d'une espèce donnée, les polymorphismes ou autres variants de l'ADN, jouent un rôle

dans la susceptibilité aux modifications de la méthylation. Dans l'étude décrite, des groupes de 8 à 15 animaux ont été étudiés pour chaque génération, et il serait également intéressant d'effectuer des mesures sur des effectifs plus importants.

Retardateurs de flamme organophosphorés : niveaux d'exposition et effet sur la qualité du sperme et le niveau d'hormones

Meeker J, Stapleton H. House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters. *Environ Health Perspect*. 2010; 118: 318-323

Analyse

Les retardateurs de flamme sont des substances chimiques largement utilisées dans des objets usuels tels que les équipements électroniques, les textiles, etc. Ces dernières années, l'utilisation de polybromodiphényléthers (PBDEs) a été interdite dans cette application par plusieurs pays, en particulier du fait des effets perturbateurs endocriniens de ces composés. L'utilisation des autres types de retardateurs de flamme a en conséquence augmenté; c'est en particulier le cas des organophosphorés. Les effets hormonaux de ces substances sont peu connus et aucune étude n'a été menée à ce jour pour étudier le lien entre exposition non professionnelle aux retardateurs de flamme organophosphorés et effets endocriniens.

L'étude américaine de Meeker et Stapleton (2010) vise à combler cette lacune en mesurant deux retardateurs de flamme organophosphorés, le TPP (phosphate de triphényle) et le TDCPP (phosphate de tris(dichloropropyle), dans les poussières de maison et en mettant ces expositions en relation avec la qualité du sperme (concentration, mobilité et morphologie des spermatozoïdes) et les niveaux de différentes hormones (testostérone, inhibine B, SHBG, œstradiol, prolactine, LH, FSH, T3, T4 et TSH) chez 50 hommes (18 à 54 ans) recrutés dans une clinique traitant l'infertilité masculine.

Le TPP et le TDCPP ont été détectés respectivement dans 48 (96 %) et 49 (98 %) des 50 échantillons de poussière analysés. De grandes variations de la concentration de ces composés ont été rapportées. Après ajustement sur l'âge et l'indice de masse corporelle, un déclin de la concentration en spermatozoïdes statistiquement significatif a été mis en relation avec une augmentation de la concentration en TPP. Ce résultat est cohérent avec d'autres études (NRC, 2000) indiquant que des retardateurs de flamme organophosphorés peuvent induire une réduction de la qualité du sperme et de la fertilité masculine. La concentration de TDCPP est apparue comme inversement associée avec celle de thyroxine (T4). Un déficit en hormone thyroïdienne ayant des effets indésirables possibles sur différentes fonctions physiologiques, cet effet du TDCPP devrait être examiné avec plus de soin dans des études ultérieures. Les taux de TDCPP et le TPP sont apparus positivement corrélés à la prolactine; une augmentation de cette hormone peut indiquer une altération de la libération, du transport ou de la capture de la dopamine. Ces relations devraient être confirmées par des études plus précises, par exemple sur l'animal.

Commentaire

Le TPP et le TDCPP ont été retrouvés dans la quasi-totalité des échantillons de poussière analysés, suggérant une large exposition de la population à ces substances. Cela n'est pas surprenant étant donné la persistance dans l'environnement de ces composés chimiques. À notre connaissance, cette étude est la première qui vise à établir un lien entre l'exposition aux TPP ou TDCPP et des effets endocriniens dans l'espèce humaine. Dans cette étude, la présence de TPP dans les poussières est associée à une diminution du compte de spermatozoïdes, celle de TDCPP à une diminution de la T₄ sérique et celle de l'un ou l'autre composé à une augmentation de la concentration sérique de prolactine. Une preuve d'une relation directe entre d'une part la présence de TPP et TDCP dans les poussières et d'autre part des modifications de marqueurs biologiques n'a pas pu être apportée. La biodisponibilité du TPP et TDCPP et les quantités de ces composés dans l'organisme des hommes intégrés dans l'étude ne sont pas connues. D'autres causes que l'exposition à ces composés des anomalies observées, ne peuvent pas être exclues. Des facteurs de confusion peuvent avoir joué un rôle, en particulier la co-exposition à des additifs des matières plastiques (par exemple des phtalates) ou d'autres retardateurs de flamme ayant des effets sur le système endocrinien et la qualité du sperme. De plus, en raison du grand nombre de relations testées, certaines des associations identifiées comme statistiquement significatives peuvent apparaître par hasard.

Les effets hormonaux du TPP et le TDCPP devraient être étudiés plus en détail dans de nouvelles études, afin de déterminer s'ils représentent une alternative valable aux PBDEs. Des études complémentaires sont requises pour confirmer les résultats obtenus dans cette étude, en particulier la baisse de la concentration en spermatozoïdes liée au TPP. De plus, le nombre de participants à cette étude (n = 50) est relativement faible, et peut ne pas permettre la détection de perturbations modérées de la qualité du sperme ou des niveaux hormonaux. Il n'est de plus pas exclu que certains facteurs de risque non considérés dans cette étude aient joué un rôle dans les résultats obtenus. Comme seule la concentration de TPP et TDCPP dans les poussières a été retenue pour estimer l'exposition à ces substances, on ne dispose pas d'indication précise sur les sources d'exposition et des biomarqueurs d'exposition plus spécifiques seraient utiles.

CONCLUSION GÉNÉRALE

De plus en plus d'études toxicologiques et épidémiologiques s'efforcent de mieux comprendre et d'évaluer les effets endocriniens que peuvent induire les substances chimiques. Le premier article de cette note explore comment les effets sur la méthylation de l'ADN peuvent amener à une perturbation de la spermatogénèse. Il fait apparaître que les défauts épigénétiques induits par l'exposition *in utero* à un perturbateur endocrinien peuvent se transmettre de génération en génération. Le deuxième article de cette note vise à établir un lien entre l'exposition aux TPP ou TDCPP (deux retardateurs de flamme organophosphorés) et des effets endocriniens dans l'espèce humaine. Elle fait apparaître que la présence de TPP dans les poussières est associée à une diminution du compte de spermatozoïdes, celle de TDCPP à une diminution de la T₄ sérique et celle de l'un ou l'autre composé à une augmentation de la concentration sérique de prolactine. Mais force est de constater que ces deux études ne permettent pas une évaluation fiable des risques pour l'homme. Un grand travail reste donc à accomplir dans les années à venir pour mieux évaluer les modes d'action et les risques liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens, en particulier à doses faibles et chroniques.

Lexique

- (1) Cryptorchidie : la cryptorchidie est une anomalie congénitale de position du testicule, qui atteint 3 à 4 % des nouveau-nés. Le testicule n'est pas descendu en suivant le trajet normal pendant la vie intra-utérine : il est resté soit dans l'abdomen soit dans la racine de la bourse.
- (2) Hypospadias : l'hypospadias est une anomalie congénitale dans laquelle l'orifice externe de l'urètre est situé sur la face inférieure de la verge.
- (3) Méthylation de l'ADN : ajout d'un groupe méthyle -CH₃ au niveau de la base cytosine.
- (4) Changements épigénétiques : Changements dans l'expression des gènes n'impliquant pas de changements de la séquence de l'ADN, en opposition aux changements génotoxiques.
- (5) Domaines de méthylation différentielle : régions spécifiques de gènes qui peuvent être méthylées, avec en conséquence une inactivation du gène, ou non méthylées, avec en conséquence une expression normale du gène.
- (6) Gènes soumis à l'empreinte génomique : groupe de gènes dont une des copies est méthylée, au niveau du domaine de méthylation différentielle, selon l'origine parentale de chacune des copies.

Revue de la littérature

Muncke J. Exposure to endocrine disrupting compounds *via* the food chain: Is packaging a relevant source? *Sci Tot Environ.* 2009; 407: 4549-4559

Publications de référence

Andersson A, Jørgensen N, Main K, et al. Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial 'tipping point'. *Int J Androl.* 2008; 31: 74-80.

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, et al. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* 2005; 308: 1466-1469

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992; 305: 609-613.

Marques C, Francisco T, Sousa S, et al. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010; 94: 585-594.

NRC (National Research Council). Toxicological Risks of Selected Flame-Retardant Chemicals. 2000; Washington DC, NAP.

Paulozzi L. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect.* 1999; 107: 297-302.

Skinner M. What is an epigenetic transgenerational phenotype? *Reprod Toxicol.* 2008; 25: 2-6

Autres publications identifiées

Brucker-Davis F, Mahler K, Bornebusch I, et al. Exposure to selected endocrine disruptors and neonatal outcome of 86 healthy boys from Nice area (France). *Chemosphere.* 2010; sous presse

Cette étude française vise à mettre en parallèle l'exposition in utero et lors de la lactation à 15 perturbateurs endocriniens (dont le vinclozoline) et le développement du fœtus et de l'enfant (poids et taille à la naissance, croissance de l'enfant, périmètre crânien).

Meeker J. Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. *Maturitas.* 2010; 66: 236-241

Les études sur l'homme des effets endocriniens des substances chimiques sont limitées. Cet article propose une revue générale de ces études, qui portent en particulier sur les PBDEs, PCBs, pesticides, phtalates et le BPA. Le nombre limité de données chez l'homme indique le besoin de recherche dans ce domaine.

Zama A, Uzumcu M. Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2010; sous presse

Cet article traite des mécanismes épigénétiques impliqués dans les effets de perturbateurs endocriniens sur le système reproductif femelle. Il est également question d'effets épigénétiques transgénérationnels. Cet article est donc intéressant à mettre en parallèle avec celui de Stouder et Giacobino (2010).

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

DNA methylation, Endocrine disruptors, Male fertility, Sperm quality.