

Effets des mélanges de phtalates à faibles doses sur la reproduction

Myriam BOUSLAMA | myriam.bousslama@gmail.com

INRS - Paris

Mots clés : Faibles doses, fertilité, phtalates, reproduction, risque cumulé

Les phtalates sont une famille de produits chimiques utilisés principalement comme plastifiants, présents dans de nombreux articles de consommation. Les études de toxicité ont montré que certains d'entre eux possèdent un effet perturbateur endocrinien*, et qu'ils sont toxiques pour l'appareil reproducteur mâle ou sur le développement. Des valeurs toxicologiques de référence ont ainsi été établies par l'Anses pour le di-(2-ethylhexyl)phtalate ou DEHP (0,05 mg/kg/j), le di-n-butylphtalate ou DBP (0,002 mg/kg/j) et le butylbenzylphtalate ou BBP (0,5 mg/kg/j) (1), mais ces valeurs ne prennent pas encore en compte les effets des mélanges. Les études de biosurveillance* rapportent pourtant une exposition simultanée à plusieurs phtalates. Les métabolites de ces polluants ubiquitaires ont été détectés dans les urines, le sang et le liquide amniotique de femmes enceintes, le lait maternel, et le sang du cordon ombilical de nouveau-nés dans la population générale. En France, une étude récente a montré la présence de ces molécules dans plus de 99 % des échantillons d'urines chez des femmes enceintes (2). Cette exposition ubiquitaire justifie la nécessité d'examiner les effets liés à une exposition combinée à plusieurs de ces substances, à des doses retrouvées dans la population. Cette note présente deux études *in vivo* évaluant les conséquences d'une exposition à un mélange de phtalates, à des doses faibles, sur la reproduction mâle et femelle.

Effets de l'exposition à un mélange de six phtalates jugés prioritaires, à long terme et à faible dose, sur la toxicité reproductive mâle chez le rat

Gao HT. et al. (2017). Effects of six priority controlled phthalate esters with long-term low-dose integrated exposure on male reproductive toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, vol.101:p.94-104.

Résumé

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet d'une exposition chronique à un mélange de phtalates, à des doses environnementales, sur la reproduction mâle chez le rat. Le mélange utilisé est un mélange équivalent de diméthylphtalate ou DMP, diéthylphtalate ou DEP, DBP, BBP, DEHP, di-n-octyl phtalate ou DNOP. Des rats de sept semaines (n = 10 par groupe) sont exposés par gavage, au mélange à 0 - 1,6 - 16 ou 160 mg/kg/jour pendant 15 semaines. Après sacrifice des animaux le lendemain de la fin de l'exposition, le poids corporel et celui des organes sont mesurés. La LH* sérique est mesurée par ELISA*, et la testostérone est dosée aux niveaux sériques et testiculaires. Un examen histologique des testicules est réalisé, ainsi que l'expression des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse*, dans le cycle cellulaire et dans l'apoptose* par western-blot*. Les résultats montrent une baisse significative de la croissance pondérale à toutes les doses au terme de l'exposition, la diminution du poids corporel étant d'environ 8 % par rapport aux témoins. Les poids relatifs du cœur et de la rate sont augmentés de manière significative pour les animaux exposés à 16 et 160 mg/kg, alors que les poids relatifs des graisses péri-rénales et des testicules sont diminués à ces deux mêmes doses. Les niveaux sériques de testostérone sont significativement diminués par rapport au

groupe contrôle, de manière dose-dépendante, alors que les niveaux de LH sont significativement augmentés dans les trois groupes exposés. L'analyse histologique montre une dégénérescence testiculaire, marquée par une désorganisation et une diminution du nombre de spermatozoïdes*. L'expression des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (StAR, P560cc, CYP17A1 et 17-b-HSD) est significativement inhibée, à la plus forte dose. De même, l'expression des protéines du cycle cellulaire Cdc2, Chk1 et CDK6 est inhibée, de manière dose-dépendante. Concernant les protéines impliquées dans l'apoptose, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est inhibée à toutes les doses tandis que celle de la protéine pro-apoptotique Bax est augmentée à la plus forte dose, suggérant une induction de l'apoptose.

Commentaire

Cette étude montre que le mélange de phtalates utilisé peut exercer un effet toxique sur le testicule à des doses inférieures à la NOAEL* et/ou LOAEL* de chacun des phtalates composant le mélange. Pour mémoire, les NOAEL du DMP, BBP, DEHP, DNOP et DEP sont respectivement de 750, 50, 5, 37 et 46 mg/kg/ jour et la LOAEL du DBP est de 2 mg/kg chez le rat par voie orale (1, 3, 4). Dans le mélange testé, chaque phtalate est présent à 0,267 ou 2,67 mg/kg/jour pour les traitements à 1,6 ou 160 mg/kg/jour respectivement. Ces résultats sont donc en faveur d'un effet additif des phtalates. Une étude précédente avait également observé des résultats similaires, où l'inhibition de la production de testostérone chez le fœtus de rat exposé à un autre mélange de phtalates équivalait à l'additivité des doses des composants de ce mélange (5). Plusieurs hypothèses mécanistiques sont proposées. D'une part, l'inhibition de l'expression des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse pourrait expliquer la baisse de

testostérone observée. D'autre part, les anomalies histologiques pourraient être liées à l'inhibition des protéines régulant le cycle cellulaire, provoquant une diminution de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération des spermatogonies. L'altération de l'expression des protéines Bax et Bcl-2 suggère une apoptose de cellules testiculaires. Il aurait été intéressant de confirmer ces différentes hypothèses par une analyse immunohistochimique de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Si pour l'effet anti-androgénique, le manque de sensibilité de l'espèce humaine rend difficile l'extrapolation de ces résultats, l'induction de l'apoptose des gonocytes* par les phtalates a déjà été observée *in vitro* chez l'humain (1). Ces résultats méritent une attention particulière et montrent l'importance de pouvoir prendre en compte les effets cumulés dans les démarches d'évaluation des risques sanitaires des phtalates.

L'exposition prénatale à un mélange de phtalates à des doses environnementales perturbe la reproduction chez les souris femelles de la génération F1.

Zhou C. et al. (2017). Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, vol.318: p.49-57

Résumé

Cette étude évalue, chez la souris, l'effet d'une exposition prénatale à un mélange de phtalates (21 % DEHP, 35 % DEP, 15 % DBP, 8 % diisobutylphtalate ou DiBP, 5 % BBP*, 15 % diisononyl phtalate ou DiNP sur la reproduction de la descendance femelle exposée *in utero*. Des femelles gestantes sont exposées, par gavage, au mélange de 0 - 20µg - 200µg - 200 mg ou 500 mg/kg/j (n = 12 par groupe), du 10^{ème} jour de gestation à la naissance de la génération F1. Une femelle par portée de la génération F1 est sélectionnée à différents âges pour effectuer un examen macroscopique (poids corporel, ovaire, utérus), et déterminer l'apparition de la puberté (ouverture vaginale) et analyser le cycle oestral. Une femelle par portée est accouplée avec des mâles à trois, six et neuf mois pour évaluer les capacités de reproduction. Le maintien de la gestation est surveillé par la prise de poids corporel. Les résultats ne montrent aucun effet de l'exposition au mélange sur la reproduction pour la génération parentale. Sur les femelles de la génération F1, le traitement diminue la distance anogénitale à la dose de 500 mg/kg/j, et augmente le poids de l'utérus à la dose de 20 µg/kg/j à JPN*8. Aucun effet sur le poids corporel, le poids du foie, des ovaires et de l'utérus, ou sur la distance anogénitale n'est observé à JPN21 et à 13 mois. En revanche, à JPN60, la distance anogénitale est diminuée pour 20 et 200 µg/kg/j et le poids de l'utérus est augmenté pour la dose de 500 mg/kg/j. A 13 mois, des kystes ovariens sont observés dans tous les groupes traités alors qu'aucune femelle n'en présente dans le groupe témoin. A toutes les doses, le traitement perturbe le cycle oestral ; on observe une augmentation de la phase oestrus et de la phase metestrus /dioestrus à la puberté et à trois mois, puis une diminution

de la phase proestrus à six mois. Des effets sur la capacité de reproduction sont également observés, notamment des difficultés d'accouplement, des avortements et des dystocies* ; une diminution du taux de grossesse* et de l'indice de fertilité* est observée aux deux plus fortes doses après trois mois d'exposition, à toutes les doses à six mois d'exposition, et une diminution de l'indice de gestation* à toutes les doses à neuf mois.

Commentaire

Il s'agit de la première étude *in vivo* montrant des effets d'un mélange de phtalates à des doses faibles (20-200 µg/kg/jour) sur la reproduction femelle. Une précédente étude chez le rat avait montré que l'exposition *in utero* à un autre mélange de phtalates augmentait le risque de malformations vaginales et utérines (6) à des doses élevées (500 mg/kg/j). Une revue de la littérature sur les effets des phtalates sur la reproduction féminine avait conclu que des concentrations élevées étaient nécessaires pour que les phtalates puissent induire de tels effets (7). Uniquement descriptive, l'étude de Zhou et al. ne permet pas d'identifier les mécanismes impliqués. Il serait intéressant de voir si l'exposition *in utero* à ce mélange a un effet sur l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope*, et entraîne une variation du taux des hormones sexuelles et de l'expression des récepteurs aux hormones gonadotropes. *In vitro*, une étude a déjà montré que ce mélange de phtalates diminue la croissance des follicules antraux* de souris, provoque une fragmentation des ovocytes et diminue la production d'hormones stéroïdiennes (8). L'altération de la stéroïdogénèse ayant récemment été observée après une exposition au DBP* sur une culture primaire de cellules de granulosa* issues de patientes traitées en vue d'une fécondation *in vitro* (9), l'extrapolation à l'espèce humaine semble possible. Concernant les effets sur la capacité de reproduction des femelles exposées *in utero*, les auteurs ont noté des avortements et dystocies plus fréquents à six et neuf mois qu'à trois mois de traitement, et à toutes les doses. Cependant, les avortements ont été définis uniquement sur la base d'une perte de poids corporel de plus de quatre grammes pendant la gestation, ce qui constitue une limite majeure de l'étude, d'autant plus qu'aucune information sur la consommation alimentaire n'est fournie. Un examen histologique de l'utérus aurait permis de dénombrer les points d'implantation et les corps jaunes, afin de déterminer les pertes pré- et post-implantatoires.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Jusqu'à présent, les démarches d'évaluation des risques ne prenaient en compte que des substances étudiées individuellement. Les effets liés à l'exposition simultanée à plusieurs phtalates, à l'instar de l'exposition humaine, font partie des nouvelles préoccupations des autorités sanitaires. Dans ce contexte, plusieurs pays participent au développement de nouvelles approches pour évaluer les risques cumulés d'une exposition combinée à plusieurs phtalates sur la santé humaine et l'environnement. Les deux études présentées dans cette note contribuent à mieux apprécier les effets des mélanges de phtalates sur la fonction reproductrice. Il en ressort que de faibles doses d'un mélange de phtalates, de l'ordre de celles considérées sans effet pour l'homme, peuvent avoir un effet délétère sur le fonctionnement testiculaire et ovarien. Ces études constituent des preuves de concept de l'effet cocktail des phtalates sur la fertilité masculine et féminine et permettront d'alimenter les modèles d'évaluation des risques cumulés.

GENERAL CONCLUSION

Until now, risk assessment approaches have considered substances that were studied individually. The effects of simultaneous exposure to several phthalates, as in the case with human exposure, are among health authorities' new concerns. In this context, several countries participate in the development of new approaches to assess the cumulative risks of combined phthalate exposure to human health and environment. The two studies presented in this note contribute to a better understanding of the effects of phthalate mixtures on reproductive function. It appears that low doses of phthalates mixtures, close to the doses considered to have no effect on humans, may have a deleterious effect on testicular and ovarian function. These studies provide proof-of-concept that phthalates have a cocktail effect on male and female fertility and will contribute to cumulative risk assessment models.

Lexique

Apoptose : mort cellulaire programmée.

Axe hypothalamo-hypophyséogonadotrope : système neuroendocrinien qui intervient dans le contrôle de la fonction de reproduction.

Biosurveillance : méthode d'évaluation de l'exposition permettant de détecter et mesurer, dans l'organisme, les substances chimiques de l'environnement ou leurs métabolites. Les dosages peuvent être faits dans le sang, l'urine, les cheveux ou le lait maternel.

Dystocie : complication au cours de l'accouchement.

Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay) : Dosage immuno-enzymatique sur support solide.

Follicules antraux : stade de maturation des follicules ovariens qui se caractérise par l'apparition de la cavité folliculaire ou antrum dans la granulosa.

Gonocytes : cellules de la lignée germinale.

Granulosa : couche de cellules folliculaires granuleuses entourant l'ovocyte.

Indice de fertilité : (nombre de femmes gestantes / nombre de femmes avec bouchon vaginal) x 100.

Indice de gestation : (nombre de femmes qui mettent bas / nombre de femmes gestantes) x 100.

LH : Hormone lutéinisante : Gonadotrophine, synthétisée par l'hypophyse, qui stimule la production de testostérone chez l'homme et l'ovulation chez la femme.

LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) : Dose la plus faible d'une substance pour laquelle un effet toxique est observé.

NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) : Dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé.

Perturbateur endocrinien : Molécule qui mime, inhibe ou modifie l'action d'une hormone et perturbe le fonctionnement normal d'un organisme.

JPN : jour post natal.

Spermatide : cellule germinale haploïde provenant de la transformation d'une spermatogonie en spermatocyte puis de la division par méiose de celui-ci qui, après une longue maturation appelée spermiogénèse, se transforme en spermatozoïde.

Stéroïdogénèse : Synthèse des hormones stéroïdiennes, c'est-à-dire ayant pour origine le cholestérol. Les hormones stéroïdiennes sont regroupées en cinq catégories selon leurs récepteurs : les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les androgènes, les œstrogènes et les progestagènes.

Taux de grossesse : (nombre de femmes gestantes / nombre de paires d'accouplement) x 100.

Western-blot : méthode permettant, par électrophorèse et transfert sur membrane, de détecter et d'identifier des protéines spécifiques d'un échantillon biologique.

Publications de référence

1 Rapport de l'Anses sur les connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des phtalates (Mars 2015). Saisine 2009-SA-0331. www.anses.fr/fr/system/files/SUBCHIM2009sa0331Ra-106.pdf

2 Dereumeaux C. et al. (2016). Imprégnation des femmes enceintes par les polluants de l'environnement en France en 2011. Volet périnatal du programme national de biosurveillance mis en oeuvre au sein de la cohorte Elfe. Tome 1 : polluants organiques: Santé publique France. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Environnement-et-sante/2016/Impregnation-des-femmes-enceintes-par-les-polluants-de-l-environnement-en-France-en-2011>

3 U.S. Consumer Product Safety Commission. Consumer Product Safety Commission by the chronic hazard advisory panel on phthalates and phthalate alternatives. (2014)

<https://www.cpsc.gov/PageFiles/169876/CHAP-REPORT-FINAL.pdf>

4 Rapport de l'ECHA Substance evaluation report for diethylphtalate, (2015)

<https://echa.europa.eu/documents/10162/5eb40dbe-31f3-4dc7-a3a5-b8b18b629c67>

5 Howdeshell KL. et al. (2008) . A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci*,vol.105 (1):153-65.

6 Hanas BR. et al.(2013). In utero phthalates effects in the female rat: a model for MRKH syndrome. *Toxicol Lett.* vol. 223 (3):315-21.

7 Kay VR. et al. (2013). Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females. *Crit Rev Toxicol* vol.43(3): 200–219.

8 Zhou C. et al. (2017). Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicol Sci*, vol.156(1) : p.217-229

9 Adir M. et al. (2017). Dibutyl phthalate impairs steroidogenesis and a subset of LH-dependent genes in cultured human mural granulosa cell in vitro. *Reprod Toxicol*, vol.69: p.13-18

Revues de la littérature

Howdeshell KL. et al. (2017). Cumulative effects of antiandrogenic chemical mixtures and their relevance to human health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*, vol. 220: p.179-188

Mariana M. et al. (2016).The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environ int*, vol.94:p.758-76.

Zhang T. et al. (2016). Di(2-ethylhexyl)phthalate: Adverse effects on folliculogenesis that cannot be neglected. *Environ Mol Mutagen*, vol.57(8): p.579-588.

Yaghjian L. et al. (2016). Maternal exposure to di-2-ethylhexylphthalate and adverse delivery outcomes: A systematic review. *Reprod Toxicol*, vol.65: p.76-86

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.