

République Algérienne Démocratique Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique Université des
Sciences et de la Technologie d'Oran « Mohamed Boudiaf »
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département du Vivant et de l'Environnement



Polycopié

Destiné aux étudiants de Master 1^{ère} Année Toxicologie Fondamentale
Appliquée.

TOXICOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Elaboré par:

Dr. BENGHALI Sofiane Med el Amine

Préface:

Ce manuel regroupe des informations pédagogiques et scientifiques qu'un étudiant de Master Toxicologie Fondamentale Appliquée doit savoir sur la Toxicologie de la Reproduction, il explique toutes les bases de ce cours de façon chronologique.

Ce document est un outil d'enseignement universitaire, il s'adresse principalement aux étudiants en biologie (Master) et a pour objectif d'initier les étudiants à cette nouvelle discipline et leur permettre d'apprendre à évaluer le risque encouru tout au long d'un cycle de reproduction. Ils vont ainsi étudier l'impact d'un xénobiotique sur les fonctions de reproduction mâle et femelle, la gestation et le développement embryonnaire et fœtal, la mise bas et le développement postnatal des jeunes. L'interprétation des résultats et le calcul des marges de sécurité permettra une évaluation du risque raisonnée et la réalisation de recommandations tant dans le résumé des caractéristiques du produit qu'auprès des prescripteurs

- La première partie comprend un descriptif des différentes cibles toxicologiques de la reproduction et du développement.
- La deuxième partie comprend les généralités Perturbateurs endocriniens et la reproduction masculine et féminine.
- La troisième partie est consacrée aux principes de base de l'Epidémiologie de la reproduction.
- La quatrième partie est consacré à l'étude de Toxicologie de la grossesse.
- Et enfin une cinquième et dernière partie qui résume les aspects les plus pertinents de la Radiosensibilité des cellules germinales.

Ce Manuel est inspiré du programme proposé dans le canevas de Master Toxicologie Fondamentale Appliquée pour la matière Toxicologie de la Reproduction.

Liste des Figures

Figure 1 Diagramme représentant les principales périodes du développement du tractus génital mâle chez l'homme et le rat, en relation avec le niveau de production de testostérone (d'après Welsh et coll., 2008).

Figure 2 Comparaison des périodes de différenciation ovarienne chez différents mammifères (d'après Monniaux et coll., 2009).

Figure 3 Principales étapes pharmacocinétiques.

Figure 4 Voies de bioactivation/détoxication des xénobiotiques.

Figure 5 Structure chimique du bisphénol A.

Figure 6 Structure chimique de base des phtalates.

Figure 7 Structures chimiques des principales familles de retardateurs de flamme bromés.

Figure 8 Structures chimiques du PFOS (sulfonate de perfluoro-octane) et du PFOA (acide perfluoro-octanoïque).

Figure 9 Structure chimique de base des parabènes.

Figure 10 L'appareil reproducteur masculin.

Figure 11 Expositions associées à des effets nuisant à la qualité du sperme.

Figure 12 L'appareil reproducteur féminin.

Figure 13 Conséquences pour la descendance de l'exposition maternelle à des toxiques.

Liste des Tableaux

Tableau 1 Etudes épidémiologiques concernant les effets de l'exposition paternelle sur l'issue de la grossesse.

Tableau 2 Produits potentiellement toxiques pour la reproduction chez la femme.

Tableau 3 Définition de la mort fœtale et de la mort néonatale.

Tableau 4 Facteurs associés à un retard de croissance intra-utérine et à une mort fœtale.

Sommaire

Préface

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

I-Cibles toxicologiques de la reproduction et du développement.	1
A-Fonction de reproduction et différences entre les espèces	2
B-Devenir d'un xénobiotique dans l'organisme	6
1-Bisphénol A	9
1.1-Exposition	10
2-Phtalates	11
2.1-Exposition	12
3-Composés polybromés (retardateurs de flamme)	13
3.1-Exposition	15
4-Composés perfluorés	16
4.1-Exposition	17
5-Parabènes	17
5.1-Exposition	18
II-Perturbateurs endocriniens et reproduction masculine et féminine.	19
A-LE SYSTÈME REPRODUCTEUR MASCULIN ET LA TOXICOLOGIE	19
A.1-L'éjaculation	21
A.2-Les effets toxiques sur la spermatogenèse et la spermiogenèse	21
A.3-Le système neuroendocrinien	25
A.4-L'axe hypothalamo-hypophysaire	25
A.5-L'axe hypophyso-testiculaire	25
A.6-Exemples d'effets des toxiques	27
A.7-La fonction sexuelle	28

B-LA STRUCTURE DU SYSTÈME REPRODUCTEUR FÉMININ ET LA VULNÉRABILITÉ DES ORGANES CIBLES	28
B.1-L'hypothalamus et l'hypophyse	30
B.2-L'ovaire	31
B.3-De la fécondation à l'implantation	33
III-Epidémiologie de la reproduction.	33
A-Études épidémiologiques BPA	33
A.1-Études chez l'animal	34
A.2-Organes et tissus cibles	35
B-Études épidémiologiques Phtalates	35
B.1-Études chez l'animal mâle	36
B.2-Organes et tissus cibles chez le mâle	37
B.3-Études chez l'animal femelle	37
B.4-Organes et tissus cibles chez la femelle	38
B.5-Études chez les poissons	38
D-Études épidémiologiques polybromés	38
D.1-Études chez l'animal	38
D.2-Organes et tissus cibles	39
C-Études épidémiologiques Composés perfluorés	39
C.1-Études chez l'animal	39
C.2-Organes et tissus cibles	40
D-Études épidémiologiques Parabènes	40
D.1-Études chez l'animal	41
VI-Toxicologie de la grossesse.	42
A-La mort embryonnaire/fœtale	43
B-Les anomalies congénitales	46
C-Le retard de la croissance intra-utérine et l'hypotrophie	48
V- Radiosensibilité des cellules germinales.	51
A-L'exposition aux rayonnements	51
B-Types d'effets considérés	53
C-Procédure d'analyse	53
D-Irradiation	54

Introduction:

La toxicologie de la reproduction et du développement et les études associées visent à mettre en évidence tout risque toxique au niveau de la fonction de la reproduction afin de mieux cerner ces effets d'un point de vue explicatif et mécanistique.

Les différents risques, notamment les problèmes de tératogénèse et de fertilité,... soulignent son importance dans l'évaluation de la sécurité d'un nouveau produit pharmaceutique, phytosanitaire ou chimique. À cette fin, il existe un certain nombre de recommandations dans le choix des études à mettre en œuvre et des paramètres à évaluer.

L'objectif de ce manuel pédagogique est de présenter les principaux aspects de cette discipline, l'état de la situation présente et les évolutions futures. Elle permettra aux étudiants et aux lecteurs d'acquérir une vision approfondie

La toxicologie pour la reproduction étudie les effets négatifs d'un médicament qui interfère avec la fonction sexuelle normale et la fertilité chez les hommes et femmes adultes. Ces effets négatifs incluent des réactions indésirables sur la fonction sexuelle et la fertilité chez les adultes hommes et femmes, ainsi qu'une toxicité pour le développement de la descendance.

La reprotoxicité est tout phénomène de toxicité pour la reproduction, en particulier quand elle entraîne la stérilité, ou pour les substances ou rayonnements tératogènes. Pour des raisons de santé publique et/ou de protection de l'environnement la mise sur le marché et l'emploi de certains produits reprotoxique peuvent être réglementés (limités ou interdits). Les reprotoxique affectent la fécondité et/ou la fertilité, soit par une toxicité directe pour les gonades ou le système reproducteur, soit en induisant un comportement ne permettant plus la reproduction. Ces produits peuvent dans le cas des perturbateurs endocriniens agir à très faible dose. Ils peuvent parfois aussi agir *in utero* en bloquant le développement normal des organes sexuels ou de glandes les contrôlant, bien avant la naissance de l'individu ; on les dits alors embryotoxiques ou fœtotoxiques.

Il existe des périodes de vulnérabilité aux reprotoxique ; ce sont notamment ceux de la formation des organes génitaux *in utero* et la phase de puberté.

Les réglementations dans le monde tendent à regrouper les substances Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxiques (ou « *CMR* »).

Ce travail sera scindé en cinq parties :

La première partie comprend un descriptif des différentes cibles toxicologiques de la reproduction et du développement.

La deuxième partie comprend les généralités Perturbateurs endocriniens et la reproduction masculine et féminine.

La troisième partie est consacrée aux principes de base de l'Epidémiologie de la reproduction.

La quatrième partie est consacré a l'étude de Toxicologie de la grossesse.

Et enfin une cinquième et dernière partie qui résume les aspects les plus pertinents de la Radiosensibilité des cellules germinales.

I-Cibles toxicologiques de la reproduction et du développement.

Selon un certain nombre d'études, une augmentation de la prévalence des troubles du versant masculin de la fonction de reproduction a été observée dans plusieurs pays occidentaux au cours des dernières décennies. Les données les mieux documentées concernent le cancer du testicule.

Il a été montré de manière non ambiguë que l'incidence du cancer du testicule, le cancer le plus fréquent chez l'homme jeune, a augmenté depuis plus de 50 ans dans de nombreux pays d'Europe. Cet accroissement est de 0,1 à 0,2 cas pour 100 000 personne-année, conduisant à un doublement de l'incidence dans les pays européens depuis 1970. En France, on observe une élévation moyenne de 2,5 % par an sur la période 1980-2005. En 2010, le taux d'incidence en France est estimé à 7 cas pour 100 000 personne / année. Cette élévation ne peut être expliquée ni par un vieillissement de la population ni par une évolution des pratiques de dépistage.

Deux types de malformations relativement fréquentes, l'hypospadias (anomalies des voies génitales externes mâles) et la cryptorchidie (anomalie de la descente testiculaire constatée à la naissance) semblent également en augmentation ; les données issues des registres sont cependant moins fiables que pour le cancer du testicule et les études ponctuelles sont en nombre limité. D'importantes variations géographiques sont constatées.

Les données disponibles en France montrent une nette augmentation de l'incidence de l'hypospadias depuis la fin des années 1970 jusqu'au début des années 2000. Pour la cryptorchidie, il n'y a pas de données suffisantes en France permettant d'estimer son évolution.

Parallèlement, une baisse de la concentration spermatique a été rapportée en Amérique du Nord et en Europe. En France, les études menées à partir des données des Centres d'études et de conservation des œufs et du sperme (CECOS) indiquent également dans certaines régions, une baisse significative de la concentration spermatique et une baisse de la mobilité des spermatozoïdes morphologiquement normaux. Globalement, la détérioration temporelle de plusieurs caractéristiques spermatiques peut être considérée comme plausible dans certains pays industrialisés.

Les connaissances sur les évolutions temporelles de la fertilité des couples sont beaucoup plus limitées. Les quelques études fondées sur des indicateurs tels que la fécondabilité (estimée à partir du délai nécessaire pour concevoir), et qui avaient souvent des limitations méthodologiques, ne montrent pas de modification dans le temps de la fertilité des couples dans certaines zones de la Suède, du Danemark ou du Royaume-Uni. Des travaux indirects indiquent qu'une détérioration des caractéristiques spermatiques aurait pu avoir un impact sur la proportion de couples souffrant d'infécondité involontaire ou éligibles pour une assistance médicale à la procréation. Dans l'ensemble, ces travaux ne permettent pas d'apporter de conclusion forte concernant l'évolution temporelle de la fertilité des couples au cours des dernières décennies dans les pays industrialisés. En l'absence de système de surveillance de la fertilité dans la plupart de ces pays, une réponse à cette question est peu susceptible d'être apportée prochainement.

Au début des années 2000, l'équipe du professeur Skakkebaek à Copenhague a formulé l'hypothèse que la survenue d'un cancer du testicule, une altération de la production et de la qualité spermatique, la cryptorchidie et l'hypospadias pouvaient avoir une origine et des causes communes résultant d'une perturbation du développement du testicule pendant la vie fœtale. Le concept de « syndrome de dysgénésie testiculaire » qui a été proposé, reste cependant controversé.

Chez les filles, dans les pays occidentaux, l'observation la plus marquante concerne la tendance séculaire à une puberté plus précoce. La courbe de cette évolution varie d'un pays à l'autre.

Une diminution est estimée à 0,3 an par décennie ; en France, une diminution de 0,18 an par décennie est observée.

En l'absence de données historiques sur les expositions environnementales à l'échelle des populations, les études descriptives sur les évolutions temporelles de la fonction de reproduction ne permettent pas d'explorer les causes de ces évolutions. De nombreuses études étiologiques ont été réalisées pour tenter d'expliquer les différences observées entre individus ; ces études ne peuvent qu'indirectement renseigner les variations. À l'heure actuelle, c'est pour les facteurs tels que le tabagisme (à l'âge adulte ou subi durant la vie intra-utérine), pour certaines expositions professionnelles et pour les polluants les plus persistants dans l'organisme que les données suggérant un impact éventuel sur la fonction de reproduction sont les plus complètes. Pour analyser l'impact d'une exposition à des composés chimiques sur la santé reproductive, de nombreux travaux en toxicologie animale et en épidémiologie ont été conduits dans différents contextes de recherche ou d'évaluation de risque. La transposition des résultats des travaux d'une espèce à une autre implique une connaissance des similitudes et des différences dans les différentes étapes du développement de la fonction de reproduction.

A-Fonction de reproduction et différences entre les espèces

Chez tous les vertébrés, le testicule et l'ovaire se développent à partir d'une ébauche embryonnaire initialement bi potentielle mâle et femelle. À différents moments de son développement, variables en fonction des espèces, cette ébauche évolue vers une différenciation mâle ou femelle selon son patrimoine génétique (mammifères, oiseaux) ou des facteurs environnementaux comme la température ou le comportement (certains reptiles et poissons). On distingue donc une détermination génétique du sexe et une détermination environnementale. Il est important de prendre en considération ces différents modes de différenciation sexuelle pour évaluer les effets de facteurs environnementaux comme les perturbateurs endocriniens. Une modification du milieu aura plus de conséquences chez les poissons et les reptiles que dans d'autres espèces de vertébrés.

Chez les mammifères, le sexe est déterminé génétiquement à la fécondation selon que le spermatozoïde est porteur ou non du chromosome Y. Le gène *SRY* sur le chromosome Y induit la différenciation mâle des cellules somatiques de la gonade en cellules de Sertoli. Chez la femelle, en l'absence de Y, la différenciation de l'ovaire s'effectue à partir de la gonade bipotentielle. Le développement fœtal et néonatal des gonades est une phase particulièrement sensible, et toute substance chimique capable de perturber ces étapes précoces aura des répercussions sur la fonction de reproduction.

En fonction du sexe, les gonades se différencient pour produire des gamètes (gamétogenèse des cellules germinales) et synthétiser des hormones (stéroïdogénèse) sous l'effet desquelles le tractus génital interne et externe va évoluer pour permettre la reproduction : mise en place d'un appareil reproducteur accordé au sexe de la gonade qui assurera les fonctions de maturation des gamètes, insémination, fécondation, gestation ou parturition.

Chez les mâles, la stéroïdogénèse débute pendant la vie fœtale dans toutes les espèces, alors que chez les femelles, sa mise en route varie selon les espèces. Ainsi, les espèces avec un système hormonal actif pendant la vie fœtale (ruminants, espèce humaine) pourraient être plus sensibles aux effets par exemple des perturbateurs endocriniens. Très précocement, le testicule fœtal sécrète deux types d'hormones : l'hormone anti mullérienne sécrétée par les cellules de Sertoli et la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig. La testostérone est responsable de la différenciation des voies génitales mâles. La protéine *Insulin-like 3* (INSL3), produite par les cellules de Leydig fœtales et adultes, est responsable du développement du gubernaculum impliqué dans la descente des testicules.

Chez les mammifères, les gonades se forment pendant la vie intra-utérine au cours du premier tiers de la gestation. Il existe un décalage dans le temps entre la différenciation mâle et femelle.

La différenciation testiculaire est plus précoce que la différenciation ovarienne. Cela implique qu'une exposition à un perturbateur endocrinien à un moment donné du développement *in utero* n'aura pas les mêmes effets chez un fœtus mâle ou femelle.

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

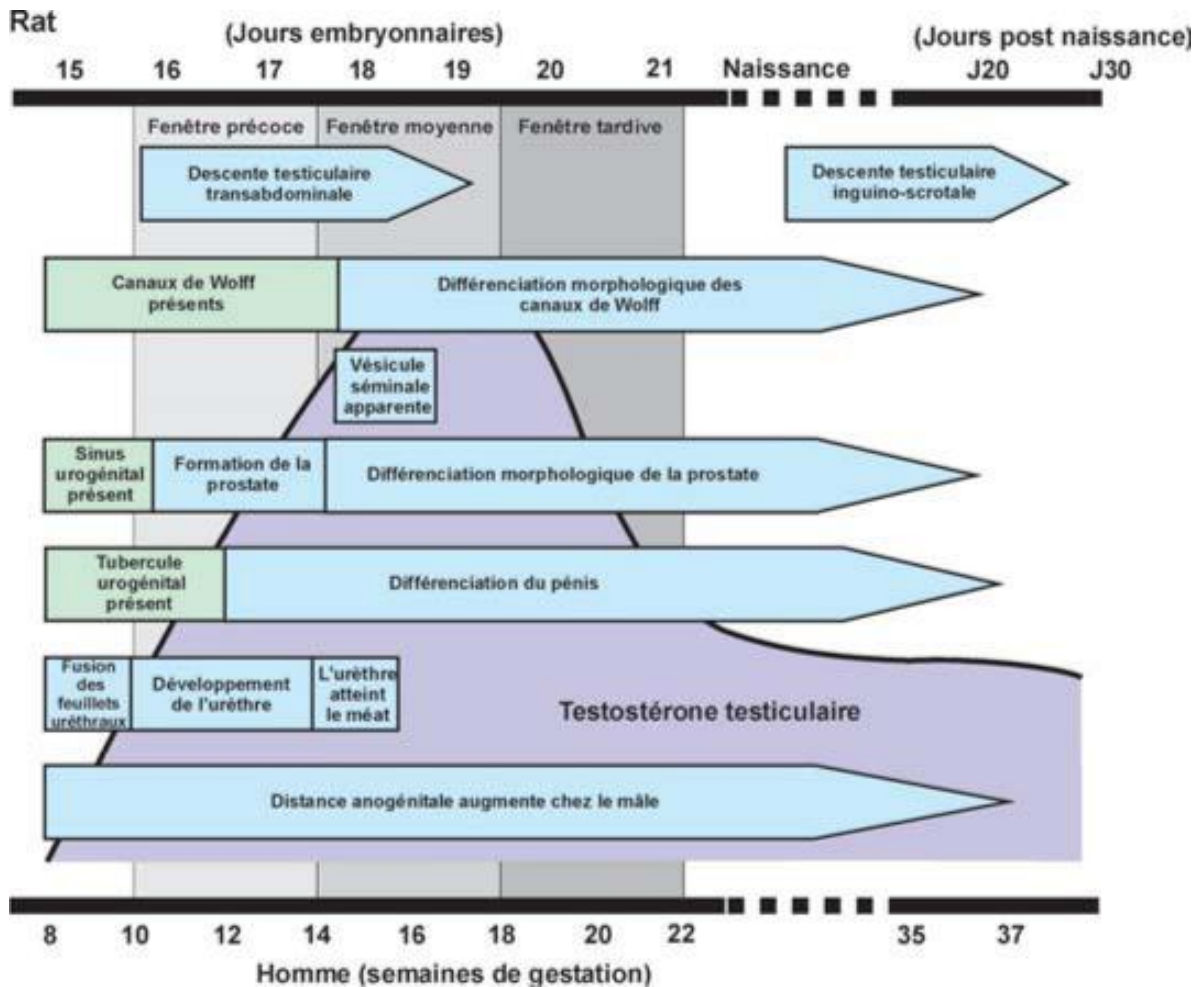


Figure 1 Diagramme représentant les principales périodes du développement du tractus génital mâle chez l'homme et le rat, en relation avec le niveau de production de testostérone (d'après Welsh et coll., 2008)

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

Le stock de follicules primordiaux formé dans l'ovaire fœtal, est fixe et déterminé pour toute la vie reproductive de la femelle tandis que la spermatogenèse produit des gamètes de façon continue, de la puberté à la sénescence, chez le mâle. Toute altération quantitative des cellules germinales survenue très tôt chez la femelle sera donc irréversible et peut avoir des effets à très long terme (20 à 30 ans) sur la fertilité. Chez le mâle, ce sont les altérations qualitatives qui risquent d'avoir des effets à long terme.

Les différentes étapes du développement ovarien et testiculaire, bien que globalement similaires chez tous les mammifères, présentent des variations importantes entre espèces et ne se déroulent pas pendant des périodes similaires. Ainsi par exemple, la formation des follicules débute dans l'ovaire pendant la vie fœtale chez l'être humain et pendant la vie Postnatale chez les rongeurs.

Cependant, les rongeurs sont le souvent utilisés comme modèles en toxicologie de la reproduction.

Il existe également des différences physiologiques (et pathologiques) au niveau du développement et de la fonction reproductive entre mammifères qui rendent l'extrapolation entre rongeurs et espèce humaine parfois difficile. Ainsi, l'ouverture vaginale qui signe le début de la puberté chez la souris n'existe pas chez les primates. À l'inverse, l'endométriase est une pathologie spécifique des primates.

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

Les rongeurs naissent beaucoup plus immatures que la plupart des autres mammifères, ce qui limite l'extrapolation des expositions reçues après la naissance. La période néonatale des rongeurs correspond du point de vue du développement à la fin de la grossesse chez l'homme. En conséquence, la période où ont lieu, par exemple, la folliculogénèse ovarienne, ou le développement du système nerveux central diffère entre l'homme et le rat, de sorte que des perturbations durant la gestation auront plus d'impact sur ces deux mécanismes chez l'homme que chez les rongeurs.

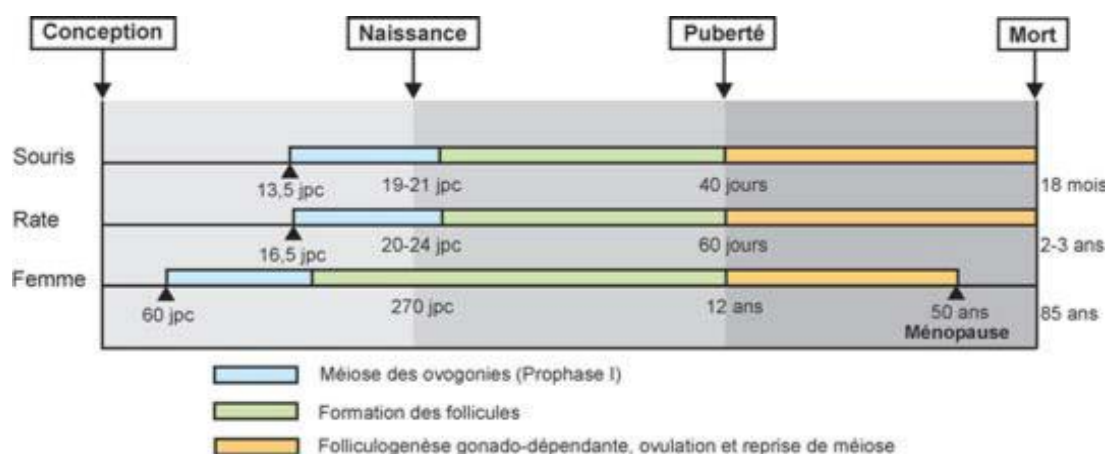


Figure 2 Comparaison des périodes de différenciation ovarienne chez différents mammifères (d'après Monniaux et coll., 2009)

Chez l'homme, le testicule, comme toutes les glandes endocrines, est sous le contrôle du complexe hypothalamo-hypophysaire.

La gonadotrophine (GnRH) libérée par l'hypothalamus stimule la sécrétion de deux hormones hypophysaires : la folliculostimuline (FSH) et l'hormone luthéinisante (LH). La FSH agissant sur les cellules de Sertoli, participe à l'initiation de la spermatogénèse. À la puberté, la LH augmente la production de testostérone qui agit directement sur les cellules de Sertoli pour assurer le bon déroulement de la spermatogénèse.

Chez la femme, les ovaires sécrètent deux hormones, l'œstradiol et la progestérone. Au cours de la folliculogénèse, les cellules de la granulosa (qui ont la même origine que les cellules de

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

L'extrapolation des résultats obtenus chez les rongeurs (souris, rat) à l'homme exige de la prudence et doit prendre en compte les différences chronologiques et physiologiques qui existent entre les deux espèces. D'autres animaux apparaissent plus pertinents que les rongeurs, notamment ceux, comme par exemple les ruminants qui présentent de longues durées de gestation et de vie, qui sont mono-ovulants et ne portent qu'un seul petit par portée.

Les effets d'exposition *in utero* à des substances chimiques peuvent se révéler à très long terme ou parfois s'atténuer avec le temps. Il est donc indispensable de réaliser des études longitudinales avec plusieurs moments d'investigation (à la naissance, au sevrage, à la puberté, à l'âge adulte). L'intervalle de temps entre l'arrêt de l'exposition et le moment de l'étude doit être pris en compte car il peut expliquer une partie des résultats contradictoires de la littérature scientifique.

B-Devenir d'un xénobiotique dans l'organisme

Le devenir d'un xénobiotique dans l'organisme peut se schématiser selon quatre étapes majeures : absorption ; distribution (avec stockage éventuel dans des organes ou des tissus cibles) ; biotransformation de la substance absorbée ; élimination.

L'absorption dépend en premier lieu des propriétés physico-chimiques de la substance elle-même, à savoir sa masse moléculaire, son degré d'ionisation, sa réactivité, sa solubilité. Les agents chimiques lipophiles sont mieux à même de traverser une membrane dont les constituants sont pour l'essentiel des lipides. Toutefois, en particulier au niveau de l'intestin, les substances très lipophiles sont moins bien absorbées en raison de la difficulté à former une solution ou une émulsion dans la lumière intestinale. La relation entre la dose externe et interne dépend donc en grande partie du niveau d'absorption, qui peut être lui-même affecté par le caractère lipophile de la substance ou encore, pour certains composés, de l'efficacité des systèmes de pompe à efflux tels que les P-glycoprotéines.

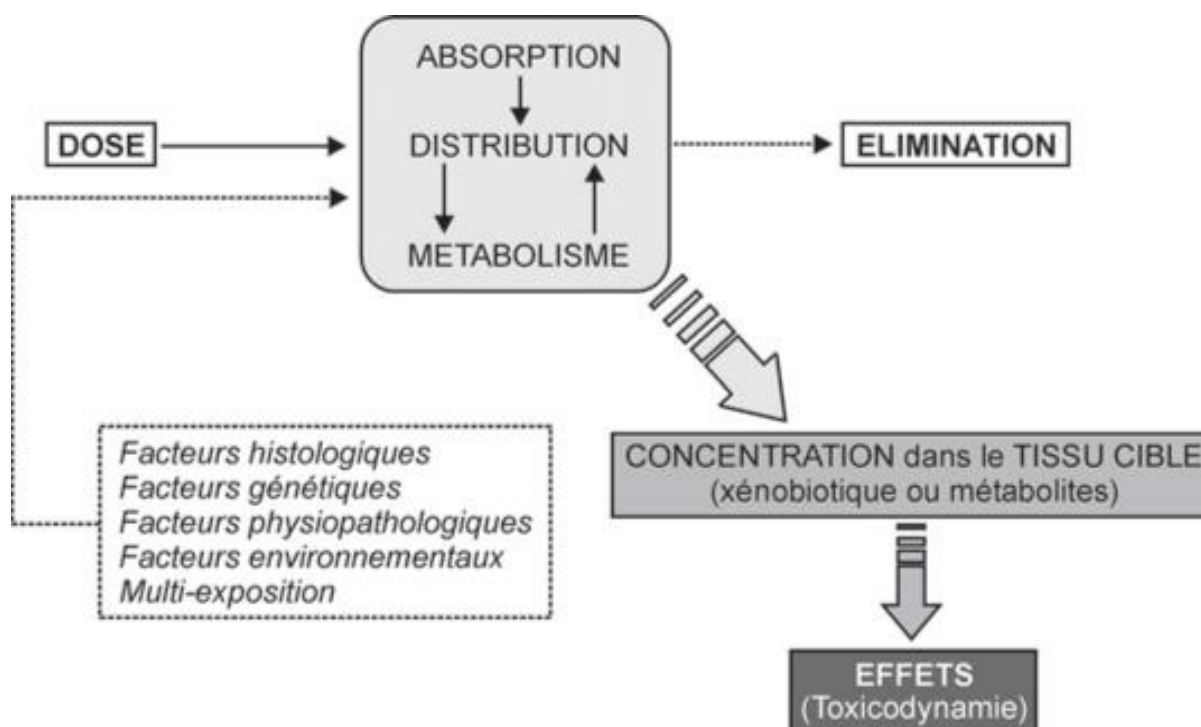


Figure 3 Principales étapes pharmacocinétiques

La différence entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme dans la paroi intestinale, de l'efflux vers la lumière intestinale ou encore du métabolisme présystémique dans le foie.

Bien que certaines barrières membranaires soient moins perméables que d'autres, les mécanismes de diffusion obéissent, de façon générale aux mêmes règles que celles qui régissent l'absorption et dépendent en premier lieu des caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique. Le franchissement de la barrière placentaire est à examiner avec attention car la vie fœtale constitue une période particulièrement sensible du développement. Si l'exposition du fœtus aux œstrogènes maternels est limitée en raison de leur liaison à l' α fœtoprotéine (protéine qui n'est normalement produite que par le fœtus au cours de son développement), nombre de substances chimiques (étiquetées comme perturbateurs endocriniens) sont beaucoup moins affines à cette protéine et se retrouvent de ce fait facilement dans la circulation fœtale. C'est ce qui semble se passer pour le bisphénol A.

Afin de pouvoir être excrétées dans l'urine ou dans la bile, les molécules doivent être hydrosolubles. La transformation chimique du xénobiotique est essentiellement catalysée par des enzymes qui fonctionnent avec des co-facteurs endogènes.

Conceptuellement, ce processus a été séparé en deux phases au cours desquelles le xénobiotique est oxydé, réduit ou hydrolysé (phase I) et/ou conjugué à l'acide glucuronique, à un groupement sulfate ou acétate, au glutathion ou encore à un acide aminé (phase II). Ces réactions prennent en charge non seulement les xénobiotiques, mais également les composés endogènes comme les stéroïdes, les prostaglandines ou encore certaines vitamines.

Les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP), enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique, jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques. On dénombre une soixantaine de CYP différents chez l'homme et une douzaine d'entre eux sont utilisés dans le métabolisme des xénobiotiques, parmi lesquels les formes 1A1/2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4 sont les plus fréquemment impliquées. Une induction du CYP2C19 (aromatase) peut favoriser une surproduction d'œstrogènes et des effets féminisants. Un polymorphisme génétique, fréquent pour les formes 2C9, 2C19 et 2D6, se traduit par des différences inter-individuelles de susceptibilité à l'action des toxiques.

Les réactions de phase II les plus fréquemment utilisées par l'organisme sont la glucuronidation et la conjugaison au glutathion et au groupement sulfate. Même si un grand nombre de tissus peuvent exprimer des enzymes de biotransformation, c'est le foie qui est l'organe principal du métabolisme. Il est toutefois possible que certaines isoformes particulières soient spécifiquement exprimées dans un tissu extra-hépatique. C'est par exemple le cas de l'aromatase qui chez l'adulte est exprimée dans les ovaires, le placenta, le tissu adipeux, l'os ou dans une moindre mesure, le testicule, mais non dans le foie, alors que les niveaux d'expression sont très élevés dans le foie fœtal.

Les voies de bioactivation passent le plus souvent par la production d'un métabolite ayant une affinité ou une activité bien plus forte que la substance initiale vis-à-vis d'une protéine de transport ou d'un récepteur nucléaire. Ainsi, des substances, inactives dans leur état initial, peuvent devenir œstrogéniques après l'intervention d'une enzyme, généralement un cytochrome P450, (il en est ainsi pour les phtalates, les composés polybromés...).

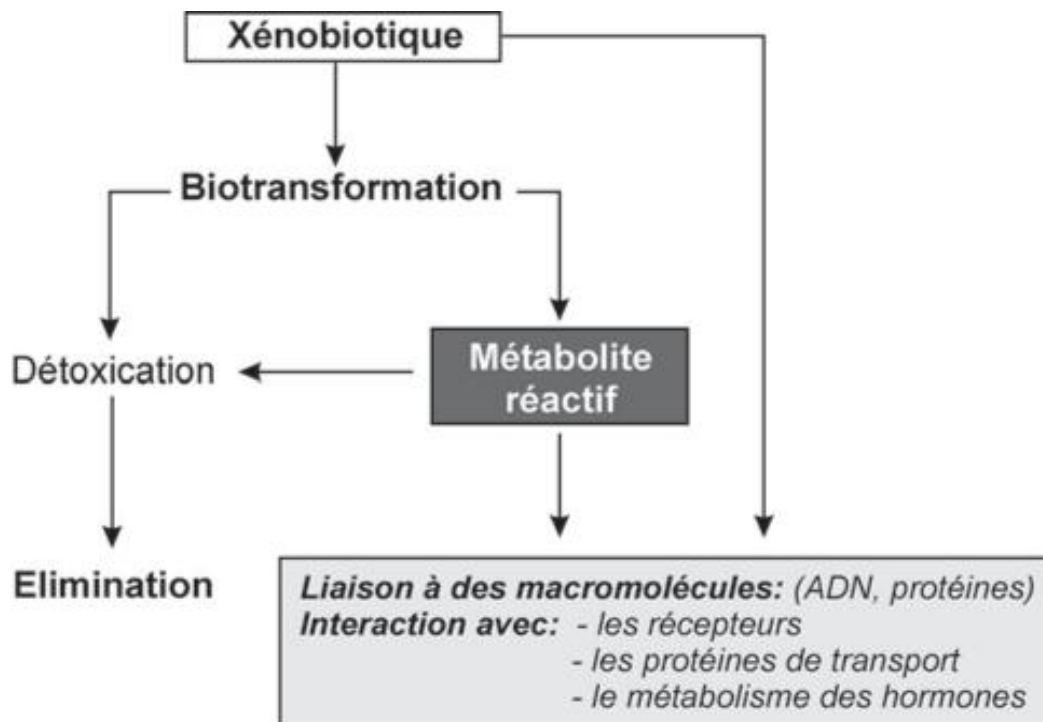


Figure 4 Voies de bioactivation/détoxication des Xénobiotiques

Une fois formés, les métabolites sont excrétés dans l'urine par le rein ou éliminés dans les fèces via la bile. L'excrétion dans le lait maternel peut également intervenir de façon

substantielle, comme cela a été montré pour les composés polybromés (PBDE), les phtalates ou le bisphénol A. Généralement, les rongeurs excrètent davantage de métabolites par voie biliaire que le chien, le singe ou l'homme. Cela est dû à des différences entre espèces dans le seuil d'excrétion biliaire des métabolites. Après avoir été éliminés dans la bile, les conjugués glucuronides et sulfates peuvent facilement être hydrolysés dans le tube digestif. Les produits de biotransformation ainsi libérés sont ensuite réabsorbés par l'intestin et de nouveau métabolisés au niveau du foie. On parle alors de cycle entéro-hépatique, dont la conséquence première est une augmentation du temps de séjour du xénobiotique dans l'organisme.

1-Bisphénol A

Le 4,4-isopropylidènediphénol, plus couramment appelé bis-phénol A (ou BPA), est un composé chimique de synthèse utilisé notamment dans la fabrication industrielle des plastiques de type polycarbonates et de celle des résines époxy.

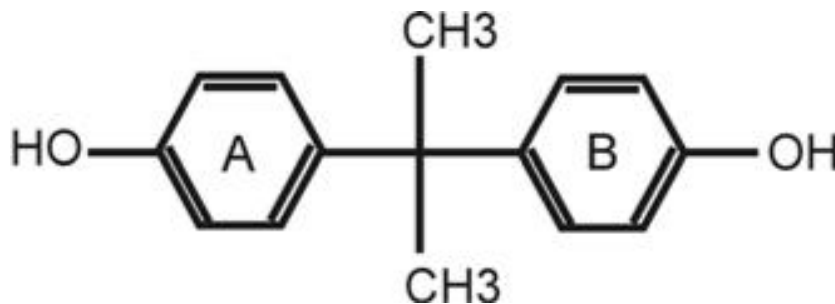


Figure 5 Structure chimique du bisphénol A

Les polycarbonates sont présents dans un grand nombre d'objets courants (CD, lunettes, certaines bouteilles plastiques, biberons) ; on retrouve les résines époxy dans les revêtements intérieurs des boîtes de conserve ou les composites dentaires. Le bisphénol A entre également dans la composition du PVC et de certains plastifiants ainsi que dans les papiers thermosensibles (délivrés par exemple par les caisses enregistreuses).

Le bisphénol A est actuellement classé en tant que substance reprotoxique de catégorie 3. Les évaluations de risque réalisées à la demande des agences sanitaires internationales (EFSA en Europe) ont conduit à définir une dose journalière tolérable de 50 µg de bisphénol A par kg de poids corporel et par jour, soit 2,5 mg par jour pour un individu de 50 kg. Depuis juillet 2010, la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de bisphénol A sont suspendues en France jusqu'à l'adoption par l'Agence française (Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) d'un avis motivé autorisant éventuellement à nouveau ces opérations.

Au cours des dernières années, un nombre croissant de travaux menés dans des laboratoires de recherche académiques ont documenté des effets divers du bisphénol A sur la reproduction.

1.1-Exposition

Selon les agences sanitaires internationales, la principale source d'exposition de la population générale est alimentaire. Elle résulte du passage du bisphénol A dans l'aliment ou la boisson à partir des polymères plastiques et résines époxy utilisés pour les emballer ou les contenir.

Chez l'adulte, certains auteurs estiment que la consommation de boissons contenues dans des bouteilles en polycarbonates, d'aliments en conserve ou de denrées chauffées au four à micro-ondes dans leur emballage, entraîne une ingestion moyenne de 0,1 µg de bisphénol A par kg de poids corporel et par jour.

Dans son avis de janvier 2010, l'Afssa estime, d'après les données de la littérature, que l'exposition des nourrissons résultant à la fois du biberon et de l'emballage du lait maternisé se situerait entre 0,2 et 2 µg de bisphénol A par kg de poids corporel et par jour. Des données similaires sont présentées dans un récent rapport (Joint FAO/WHO *Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Summary Report* 1-5 novembre 2010)⁹.

La manipulation de papiers thermosensibles (délivrés par les caisses enregistreuses) ou l'inhalation de poussières contaminées par le bisphénol A, pourraient constituer d'autres sources de contamination en particulier pour certaines populations. Par ailleurs, des dérivés du bisphénol A utilisés en tant que composites dentaires induisent des taux salivaires élevés en bisphénol A chez les patients. Ceci suggère que plusieurs voies d'exposition ou encore l'exposition à certains dérivés du bisphénol A doivent être envisagées.

Les mesures de bisphénol A effectuées dans le sang, l'urine, le lait maternel et d'autres tissus indiquent que plus de 90 % des personnes vivant dans les pays occidentaux sont exposées à des niveaux détectables de bisphénol A. Des taux supérieurs à la limite de détection de 0,5 µg/l ont été retrouvés dans le placenta, le liquide amniotique et le fœtus chez les rongeurs et dans l'espèce humaine. Le bisphénol A est donc capable de passer la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus.

D'après une étude allemande, les enfants (3-5 ans) constituent le sous-groupe présentant la plus forte imprégnation, avec un taux urinaire moyen de 3,5 µg/l. En France, les taux urinaires dans un échantillon de femmes le jour de l'accouchement en bisphénol A total et libre sont en valeur médiane égales à 2,9 et 0,5 µg/g de créatinine respectivement et le ratio bisphénol A libre/bisphénol A total est de 0,17.

Les niveaux d'exposition chez l'adulte comme chez l'enfant estimés à partir des taux urinaires correspondent à une exposition inférieure à la dose journalière tolérable de 50 µg/kg/j.

Chez l'homme adulte, le bisphénol A absorbé par voie digestive est éliminé rapidement dans l'urine sous forme de BPA-glucuronide. La demi-vie plasmatique est de l'ordre de 4-6 h. Dans le contexte d'une exposition ponctuelle, une grande partie du BPA est éliminée en 24 h. Des valeurs semblables ont été récemment rapportées chez les rongeurs et le singe.

Les extrapolations des données de pharmacocinétique de l'animal à l'homme sont délicates en raison d'importantes différences interspèces dans les processus d'élimination. Des polymorphismes des enzymes de conjugaison chez l'homme pourraient entraîner d'importantes variations individuelles dans la capacité de détoxification. Enfin, des processus

de déconjugaison des métabolites (libérant du bisphénol A) pourraient intervenir dans certains organes cibles.

2-Phtalates

Les phtalates sont le produit d'estérification d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools. On distingue des esters phtaliques dont les deux fonctions

acides sont estérifiées par le même alcool (DEHP, DBP), ou par des alcools différents (BBP) ou encore par des alcools de type oxo (DINP, DIDP).

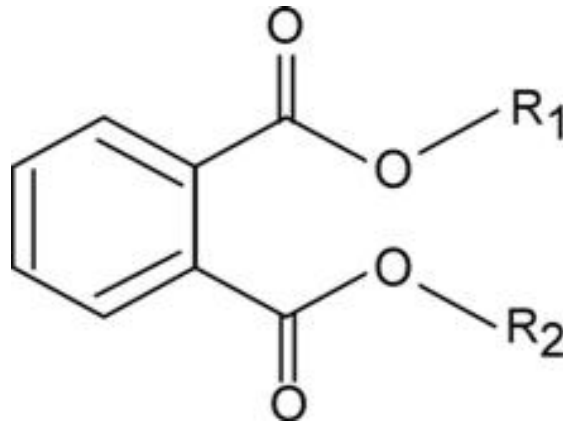


Figure 6 Structure chimique de base des phtalates

R1,R = C2H5 : DEP Diéthyl-phtalate ;

R1,R2 = C8H17 : DEHP Di(2-éthyl-hexyl)-phtalate

R1,R2 = C4H9 : DBP Dibutyl-phtalate

R1,R2 = C9H20 : DINP Diisononyl-phtalate

R1,R2 = C4H9, C7H7 : BBP Butylbenzyl-phtalate

Parmi les phtalates les plus fréquemment utilisés, outre le DEHP, mentionnons le BBP, le DBP, le DEP et le DINP.

Les phtalates sont retrouvés dans plusieurs produits utilisés couramment tels les adhésifs, les revêtements de sol en vinyle, les huiles lubrifiantes, les condensateurs électriques, les détergents, les solvants, les produits pharmaceutiques, les fils et les câbles électriques et les produits cosmétiques (parfums, déodorants, lotions après rasage, shampooings, aérosols pour cheveux, vernis à ongles...). La particularité des phtalates utilisés en plasturgie tient au fait qu'ils ne sont pas liés de manière covalente aux polymères auxquels ils confèrent leur souplesse. Ils peuvent donc facilement migrer dans les matériaux d'emballages et être

relargués dans le milieu environnant, en particulier lorsque les plastiques qui en contiennent sont soumis à des températures élevées.

Des interdictions et restriction d'usage ont été promulguées par la Commission européenne : dans les préparations à destination du grand public (peintures et colles...), tous les phtalates classés CMR1 et 2 sont interdits ; concernant les articles, interdiction du DEHP, DBP et BBP dans la production des jouets et les articles pour enfants ; interdiction du DINP, DIDP et DNOP(di-n-octyl phtalate) pour les jouets des enfants de moins de trois ans. Les phtalates tels que le DBP, DEHP, BBP ne sont pas autorisés dans les produits cosmétiques ; le DEHP est également interdit dans les matériaux de contact alimentaire. L'usage du DEHP dans les dispositifs médicaux est restreint si les nouveau nés, les femmes enceintes et allaitant, doivent y être exposés.

Les évaluations de risque effectuées par les autorités sanitaires, l'EFSA en Europe, sur le DEHP, le DBP, le DIDP, le BBP et le DINP ont abouti à des doses journalières tolérables (DJT) de respectivement 50, 10, 150, 500 et 150 µg par kg de poids corporel et par jour.

2.1-Exposition

L'exposition humaine à certains phtalates est importante et croît régulièrement en raison de la très large utilisation de cette famille de composés et de l'augmentation des niveaux de production au cours des trente dernières années.

Cette exposition peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou encore la nourriture et résulte à la fois de l'inhalation, de l'ingestion ou encore de l'absorption percutanée de ces produits. L'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des emballages contenant des phtalates demeure la principale source d'exposition pour la population générale adulte. L'alimentation est en particulier la principale source d'exposition pour le DEHP, DBP et DIBP (diisobutyl-phtalate). Chez les enfants, l'ingestion via les contacts mains-bouche pourrait être également importante.

L'exposition chez l'adulte au DEHP est estimée en moyenne à environ 2 µg/kg de poids corporel par jour d'après les données de concentrations urinaires en DEHP ou de ses métabolites dans les populations occidentales. Elle est légèrement plus faible pour les autres phtalates. On observe peu de différences entre les hommes et les femmes.

Comparés (dans le même temps et dans les mêmes études) aux adultes, tous les enfants (0-3 ans) présentent des concentrations urinaires 3 à 5 fois plus élevées. D'après des données allemandes, 1,5 % des enfants en Allemagne présentent une exposition au DEHP supérieure au niveau d'exposition pour lequel l'absence d'effet adverse n'est pas certaine. En France, dans un échantillon de femmes le jour de l'accouchement, les taux urinaires en métabolites sont en valeur médiane égales à 42 µg/l et 28 µg/l respectivement pour le 5OH-MEHP et le 5oxo-MEHP.

Sur la base des teneurs en DEHP dans les aliments pour bébés, des auteurs ont estimé que l'exposition par la voie alimentaire des nourrissons de moins de 6 mois était de près de 10 µg/kg pc/j et de près de 20 µg/kg pc/j chez les enfants de plus de 6 mois.

Depuis les interdictions et restriction d'usage, d'autres phtalates (DINP) sont plus souvent retrouvés en particulier chez les enfants.

Les dispositifs médicaux (poches de sang, tubulures...) représentent pour certains sous-groupes de la population une source non négligeable d'exposition aux phtalates, en particulier au DEHP. L'exposition via les dispositifs médicaux touche principalement les hémodialysés, les donneurs et receveurs de plaquettes et les enfants prématurés. *L'European Chemicals Bureau* (ECB) estimait en 2008 que l'exposition pouvait atteindre 3 000 µg/kg pc/j, chez les hémodialysés adultes et 1700 µg/kg pc/j chez les nouveau-nés transfusés.

Selon les composés, la demi-vie plasmatique chez l'Homme est de 8 à 48 heures. Elle est de 18 heures pour le DEHP. Si on n'observe pas de bioaccumulation, il est important de signaler que comme pour le BPA, l'exposition est continue du fait de la diversité des sources de contamination (alimentaire, environnement, cosmétiques...). Les études réalisées chez l'homme ou la femme montrent que certains phtalates ou leurs métabolites sont retrouvés dans les urines, le plasma sanguin, le plasma séminal, le lait maternel, le liquide amniotique et le sang du cordon.

Le métabolisme des phtalates conduit à la production de métabolites non oxydés et oxydés. Des études récentes semblent indiquer que chez l'homme, les principaux métabolites dans les urines sont les métabolites oxydés. La mesure des métabolites oxydés dans les liquides biologiques permet d'exclure les contaminations liées au matériel utilisé lors du dosage.

La concentration maximum sanguine en MEHP (métabolite du DEHP) est 7,5 fois plus faible chez le primate non humain (singe) que chez le rat. Chez l'homme et le singe, le MEHP est présent dans le sang et l'urine essentiellement comme glucuro-conjugué. Cependant, des métabolites de DEHP, avec des chaînes ester carboxylées, sont retrouvés sous formes conjuguées et libres dans les échantillons urinaires humains. Différents tissus peuvent être la cible de ces métabolites (testicule, ovaire...). Les différences dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion entre différentes espèces (rongeurs, singes et humains) peuvent expliquer des différences de sensibilité aux effets des phtalates.

3-Composés polybromés (retardateurs de flamme)

Il existe aujourd'hui de nombreux types de retardateurs de flamme, agissant soit par voie chimique soit par voie physique. Ceux-ci sont incorporés dans les produits et matériaux concernés (textiles, rideaux, vêtements, sièges, plastiques, mousses, capitonnages, résines, circuits imprimés, câbles, téléviseurs, ordinateurs...) à des teneurs allant en général de 5 à 20 %.

Les retardateurs de flamme chimiques appartiennent à différentes familles dont les plus utilisées sont les composés polybromés (RFB) tels que les polybromodiphényléthers (PBDE), le 1,2,5,6,9,10 hexabromocyclododécane (HBCD) et le tétrabromobisphénol A (TBBPA). Ils représentent 30 % des retardateurs de flamme au niveau européen.

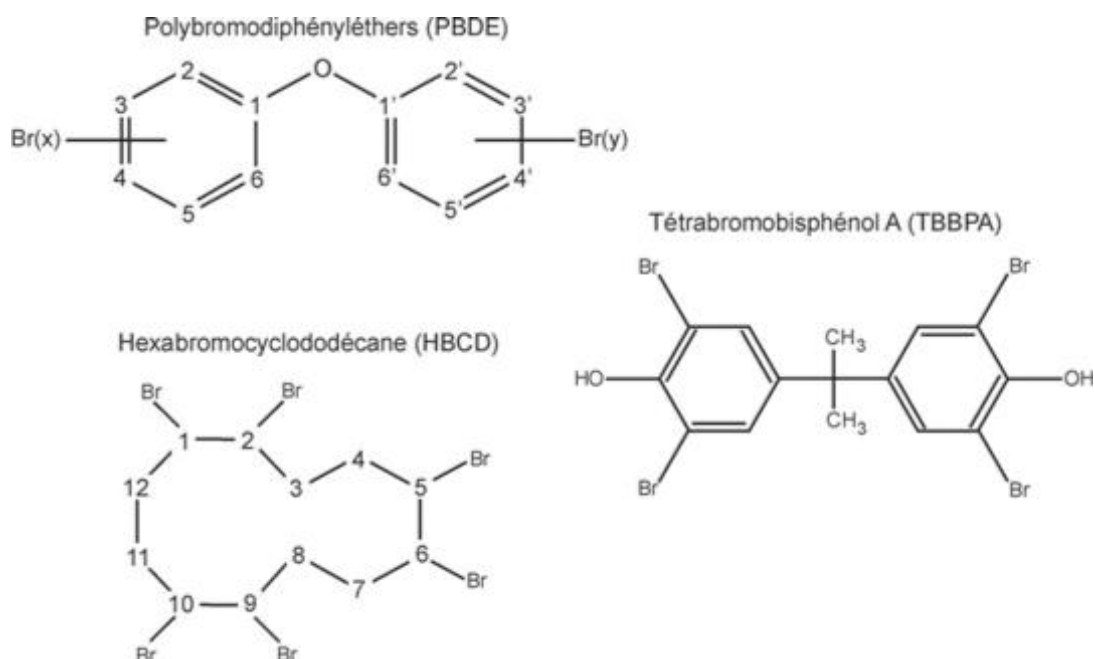


Figure 7 Structures chimiques des principales familles de retardateurs de flamme bromés

Du point de vue de leur structure chimique, les PBDE sont des éthers aromatiques bicycliques. Leur classification s'appuie sur le nombre et la position des atomes de brome dans le cycle.

Pour les différencier, la nomenclature usuelle consiste à les désigner par un nombre donnant des informations sur le degré de bromation (nombre d'atomes de brome dans la molécule) et sur la position des atomes de brome sur les cycles benzéniques.

Depuis août 2004, la réglementation européenne interdit les deux mélanges « techniques » de PBDE utilisés industriellement, l'octa-BDE et le penta-BDE, mais autorise toujours le deca-BDE. Ce dernier est essentiellement constitué de BDE 209 ou décabromodiphényléther, celui-ci pouvant se décomposer en congénères plus faiblement bromés par dégradation physique (notamment sous l'influence des rayonnements UV).

Le TBBPA a une structure chimique proche de celle du BPA, avec deux cycles aromatiques liés par un pont carbone. La présence de deux groupements hydroxyles rend ce composé plus polaire que les autres représentants de la famille des retardateurs de flamme bromés, et le distingue donc sur le plan des propriétés physico-chimiques. Le TBBPA est en particulier moins bioaccumulable dans les tissus gras et plus sujet aux réactions de métabolisme de phase II (conjugaison) que les PBDE.

L'HBCD occupe la troisième place au classement des retardateurs de flamme bromés les plus utilisés. L'HBCD « technique » est un mélange principalement constitué de trois diastéréoisomères (composés identiques sauf sur le plan de la disposition spatiale de leurs atomes). C'est l'isomère γ que l'on retrouve de façon prédominante dans les échantillons biologiques d'origine animale.

Les retardateurs de flamme polybromés se caractérisent globalement par des propriétés physico-chimiques qui les rendent lipophiles et bioaccumulables, au même titre que certains autres polluants organiques persistants (POP) halogénés (dioxines, polychlorobisphényles).

Bien que la production de certains RFB (notamment mélanges Penta-BDE et Octa-BDE) ait été stoppée dans certains pays dont l'Europe, leur présence s'est accrue ces dernières décennies dans l'environnement, dans la faune, mais également chez l'Homme.

Il n'y a pas à l'heure actuelle de DJT définie par les Agences sanitaires. Les évaluations sont en cours. À titre d'indication, les valeurs de référence émises par l'agence américaine (US-EPA) sont de 0,1 µg/kg pc/j pour le BDE 99 et de 7 µg/kg pc/j pour le BDE 209.

3.1-Exposition

En raison du caractère lipophile de ces polluants, les produits alimentaires riches en lipides (viande, poisson, lait) contribuent de façon majeure à l'exposition de l'Homme aux retardateurs de flamme bromés. Toutefois, les habitudes alimentaires très diverses d'un continent à l'autre expliquent une disparité observée parmi les principaux contributeurs à l'exposition.

Les voies d'exposition aérienne (par l'ingestion de poussières) et directe (par contact avec certains matériaux plastiques) représentent d'autres voies d'exposition aux congénères les plus hautement bromés comme le BDE 209, en particulier chez les jeunes enfants.

En population générale, les niveaux d'exposition aux PBDE estimés sont de l'ordre de 1 ng/kg de poids corporel/jour.

La présence de plusieurs congénères dans certains fluides et tissus biologiques humains est avérée. Dans le sérum ou le lait maternel, les teneurs observées sont de l'ordre de quelques ng/g de lipide.

Depuis le début des années 2000, une tendance à une diminution des niveaux d'imprégnation a été rapportée pour les principaux congénères de type PBDE, correspondant à un arrêt de la production et de l'utilisation des deux mélanges industriels Penta- et Octa-BDE. En revanche, cette diminution ne semble pas concerner les autres composés toujours utilisés, en particulier le BDE 209, l'HBCD ou encore le TBBPA, mais pour lesquels les données disponibles sont limitées. D'après les rapports d'évaluations disponibles, les niveaux d'exposition à l'HBCD sont de 2 à 10 ng/kg/jour pour l'exposition provenant des poussières de textiles et de 20 ng/kg/jour via l'alimentation.

Pour le TBBPA, le niveau d'exposition est de 80 ng/kg/jour via l'environnement.

Les études conduites chez le rat indiquent qu'après administration orale le BDE 209 est éliminé principalement dans les fèces alors que l'élimination urinaire est négligeable. La demi-vie du BDE 209 est estimée à 2 jours chez le rat et 14 jours chez l'homme. Globalement, les demi-vies des PBDE varient de quelques semaines (BDE 209) à quelques années (BDE 47).

Pour les différents congénères, des métabolites hydroxylés se forment et des conjugués sulfates et glucuronides sont éliminés dans l'urine.

4-Composés perfluorés

Le terme « composés perfluorés » (PFC) se réfère à une vaste famille de molécules chimiques comprenant des oligomères et des polymères. Il s'agit de composés tensio-actifs, neutres ou anioniques, présentant une grande stabilité sur les plans thermique, chimique et biologique.

Les composés perfluorés ont été ou sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles, notamment pour les traitements anti-taches et imperméabilisants de textiles (vêtements, tissus, tapis, moquettes...), les enduits résistants aux matières grasses, les emballages en papier et/ou carton autorisés pour le contact alimentaire, les revêtements anti-adhésifs, les mousses anti-incendie, les tensioactifs utilisés dans l'exploitation minière et les puits de pétrole, les cires à parquet, ou encore certaines formulations d'insecticides. En conséquence, les consommateurs des pays industrialisés sont aujourd'hui en contact avec ces composés dans leur vie quotidienne, à travers un grand nombre de produits manufacturés. Comme beaucoup d'autres polluants chimiques d'origine anthropique, les composés perfluorés peuvent être relargués dans l'environnement à chaque étape de leur cycle de vie, puis retrouvés dans la chaîne alimentaire et *in fine* dans les organismes vivants.

Un sous-groupe important au sein de cette famille de polluants chimiques émergents depuis quelques années, est celui des tensio-actifs organiques tels que le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), qui présentent une chaîne carbonée à huit atomes de carbone. Ces deux substances étant les principaux produits de dégradation finaux de nombreux composés perfluorés, elles sont retrouvées de façon généralement prépondérante dans les matrices environnementales ou biologiques, et sont le plus souvent les seules étudiées.

Par leur structure chimique comportant d'une part une chaîne carbonée polyfluorée apolaire et d'autre part un groupement fortement polaire, les PFC se caractérisent par des propriétés à la fois hydrophobes et lipophobes, et de ce fait ne s'accumulent pas dans les tissus adipeux. La demi-vie du PFOS et du PFOA est toutefois de plusieurs années chez l'Homme. Le PFOS a été récemment inclus dans la liste des polluants persistants de la convention de Stockholm (UNEP *United Nations Environment Programme*). Depuis 2006, le PFOS est interdit dans certains usages par la réglementation européenne.

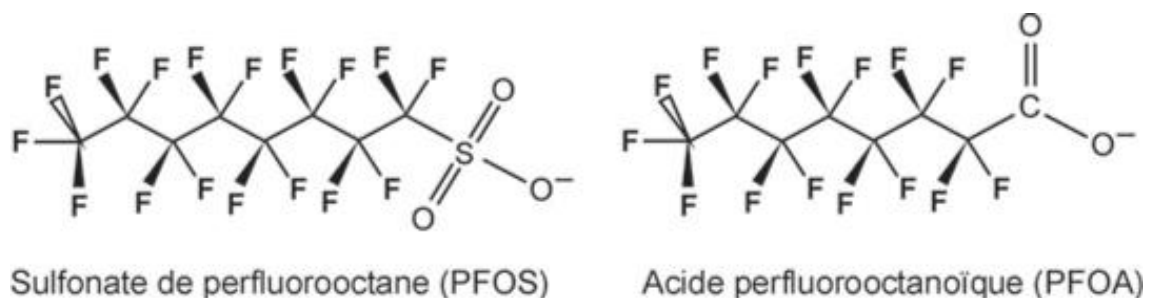


Figure 8 Structures chimiques du PFOS (sulfonate de perfluorooctane) et du PFOA (acide perfluorooctanoïque)

Dans son rapport scientifique rendu public en 2008, le panel Contam de l'EFSA a établi une valeur de dose journalière tolérable pour le PFOS égale à 0,15 µg/ kg/jour et pour le PFOA de 1,5 µg/kg/jour.

4.1-Exposition

La source alimentaire apparaît comme la voie d'exposition principale aux composés perfluorés, en particulier pour l'adulte. D'autres sources notamment via le contact direct avec certains revêtements de type tapis ou moquette, représentent toutefois une voie non négligeable d'exposition pour les jeunes enfants. De façon générale, les valeurs estimées d'exposition aux composés perfluorés varient de quelques ng à quelques dizaines de ng/kg/jour. Elles apparaissent en deçà des limites tolérées pour l'adulte en population générale mais proches des limites pour des sous-populations particulièrement exposées. Pour les gros consommateurs de poisson, l'apport alimentaire en PFOS via le poisson a été estimé à 0,2 µg/kg/jour.

La présence de plusieurs représentants de cette classe de composés dans des fluides et tissus biologiques humains est avérée.

Dans le sérum, les teneurs observées sont de l'ordre de quelques ng à quelques dizaines de ng/ml. Le PFOS et le PFOA apparaissent comme étant deux principaux biomarqueurs d'exposition aux composés perfluorés.

Une tendance à la diminution des niveaux d'imprégnation en population générale est observée aux États-Unis depuis 2002, date correspondant à l'arrêt de la production d'une des principales sociétés productrices. En revanche, l'absence de données concernant les autres pays ne permet pas de généraliser cette observation.

Plusieurs études ont fait état d'un transfert mère-fœtus via le sang du cordon. Toutefois, les niveaux de concentration rapportés dans le sang du cordon sont systématiquement inférieurs aux teneurs observées dans le sang maternel (d'un facteur 1,5 à 3,5). L'existence d'une exposition du nourrisson allaité via le lait maternel est de même démontrée, même si cette voie de transfert de la mère à l'enfant apparaît plus limitée que pour d'autres classes de polluants organiques halogénés tels que les dioxines, les PCB, ou les retardateurs de flamme bromés.

Les demi-vies plasmatiques estimées pour le PFOS et le PFOA sont de l'ordre de quelques heures chez le rongeur, quelques jours chez le primate et quelques années chez l'homme. Parmi les polluants bioaccumulables, ils sont moins persistants que d'autres substances plus lipophiles tels les dioxines ou les PCB.

Une élimination plus rapide chez la femelle a été montrée chez l'animal, cette différence étant toutefois moins significative dans l'espèce humaine. Par ailleurs, on observe une importante variabilité inter et intra-espèce des paramètres pharmacocinétiques selon les composés et en particulier selon la longueur de la chaîne carbonée, les composés à plus longue chaîne présentant un caractère plus persistant.

5-Parabènes

Les parabènes sont des esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, présentant un cycle benzénique substitué en para par un groupement ester avec des chaînes alkyles de taille variable. Les structures les plus courantes sont : méthyl parabène, éthyl parabène, propyl parabène, butyl parabène, benzyl parabène.

En raison de leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, les parabènes sont très largement utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments. Leur première utilisation en tant que conservateur remonte à 1920.

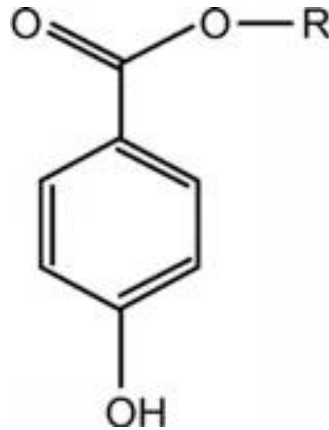


Figure 9 Structure chimique de base des parabènes

R = chaîne alkyle (méthyl, éthyl, propyl, butyl, ...)

Les composés de la famille des parabènes autorisés comme additifs alimentaires sont: le méthyl parabène (E218) et son sel de sodium (E219) et l'éthyl parabène (E214) et son sel de sodium (E215). Leur emploi en tant qu'additifs alimentaires est régi par la directive européenne 95/2/CE du 20 février 1995.

Les parabènes les plus utilisés en cosmétique sont le méthyl, l'éthyl, le propyl, le butyl et l'isobutyl parabène. La directive 76/768/CEE régit l'utilisation des parabènes dans les produits cosmétiques et fixe leur emploi à 0,4 % (en acide) pour un ester et 0,8 % (en acide) pour les mélanges d'esters. Dans les médicaments, c'est le propyl parabène qui est principalement utilisé.

Les autorités sanitaires européennes (EFSA) ont défini une dose journalière tolérable pouvant aller jusqu'à 10 000 µg/kg/jour pour le mélange méthyl et éthyl parabènes.

5.1-Exposition

Du fait de leur emploi comme conservateurs dans plus de 80 % des produits cosmétiques (shampoings, crèmes hydratantes, mousses à raser...), dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques, et comme additif alimentaire, l'être humain est régulièrement exposé aux parabènes.

L'exposition aux méthyl, éthyl, propyl, et butyl parabènes a été évaluée dans un échantillon représentatif de la population générale des États-Unis (personnes âgées de 6 ans et plus) entre 2005 et 2006. Le méthyl et le propyl parabènes ont été détectés dans plus de 90 % des échantillons, l'éthyl et le butyl dans un peu moins de 50 %. La concentration médiane du méthyl parabène était de 63,5 µg/l d'urine et celle du propyl parabène de 8,7 µg/l. Les

adolescentes et les femmes adultes avaient des concentrations significativement plus fortes que les adolescents et hommes adultes.

Une estimation à partir des différentes sources possibles d'exposition indique un taux de 1 300 µg/kg/jour pour la population américaine.

La confirmation de la capacité des parabènes d'être absorbés systématiquement à partir d'applications topiques a été démontrée chez l'homme. Le n-butyl parabène est détecté dans le sérum en 1 h et dans l'urine avec un pic à 8-12 h, dont la majorité conjuguée sous forme de glucuronide.

II-Perturbateurs endocriniens et reproduction masculine et féminine.

Les effets d'agents toxiques sur la reproduction présentent nombre de différences importantes et tout à fait particulières par rapport aux effets sur d'autres systèmes. Tandis que les autres formes de toxicité liées à l'environnement impliquent habituellement le développement d'une maladie chez la personne exposée, du fait que la reproduction exige une interaction entre deux individus, la toxicité pour la reproduction s'exprime au niveau d'une unité reproductrice, ou couple. Cet aspect particulier, couple-dépendant, même s'il est évident, est distinctif de la toxicité pour la reproduction. Il est possible que l'exposition d'un membre du couple reproducteur (l'homme, par exemple) à un toxique se manifeste par une issue de la reproduction défavorable chez l'autre membre du couple (une augmentation de la fréquence des avortements spontanés). Toute l'étude des causes environnementales de la toxicité pour la reproduction doit prendre en compte cet aspect couple-dépendant.

D'autres aspects distinctifs reflètent les problèmes posés par la toxicité pour la reproduction. A l'inverse de la fonction rénale, cardiaque ou pulmonaire, la fonction génitale ne s'exerce que par intermittence, ce qui signifie que l'exposition professionnelle peut interférer avec la reproduction sans être remarquée au cours des périodes pendant lesquelles la fécondité n'est pas souhaitée. Ce caractère intermittent rend plus difficile l'identification d'un produit toxique pour la reproduction chez les êtres humains. Une autre caractéristique particulière de la reproduction, découlant directement des considérations précédentes, est qu'une évaluation complète de l'intégrité fonctionnelle du système reproducteur exige que le couple essaie d'avoir un enfant.

A-LE SYSTÈME REPRODUCTEUR MASCULIN ET LA TOXICOLOGIE

La spermatogenèse et la spermio-genèse sont les processus cellulaires qui produisent des cellules sexuelles mâles matures. Ces processus ont lieu dans les tubes séminifères des testicules de l'homme pubère, comme le montre la figure 10. Les tubes séminifères de l'homme mesurent entre 30 et 70 cm de long et 150 à 300 µm de diamètre (Zaneveld, 1978). Les spermatogonies (cellules souches), disposées le long de la membrane basale des tubes séminifères, sont les cellules de base pour la production de spermatozoïdes.

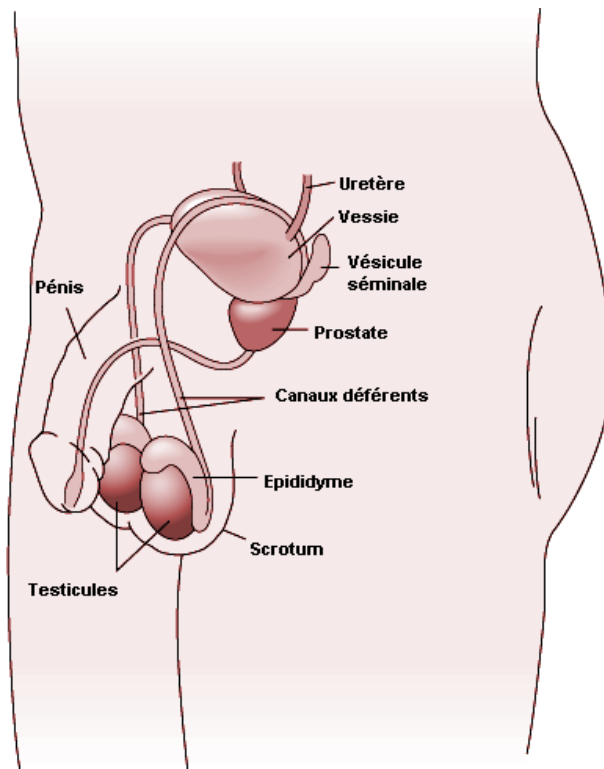


Figure 10 L'appareil reproducteur masculin

Le spermatozoïde parvient à maturité par une série de divisions cellulaires au cours desquelles les spermatogonies prolifèrent et deviennent des spermatocytes de premier ordre. Ceux-ci, encore inactifs, traversent les étroits espaces formés par les cellules de Sertoli et atteignent la face lumineuse de cette barrière testiculaire. Au moment où les spermatocytes atteignent la barrière membranaire du testicule, la synthèse de l'ADN, le matériel génétique du noyau cellulaire, est, pour l'essentiel, achevée. Lorsqu'ils rencontrent la lumière du tube séminifère, ils passent par un type particulier de division cellulaire qui se produit uniquement dans les cellules germinales et qui s'appelle méiose. La division cellulaire méiotique provoque le clivage des paires de chromosomes du noyau, de sorte que chaque cellule germinale qui en résulte ne contient qu'une seule copie de chaque brin de chromosome au lieu d'une paire.

Au cours de la méiose, les chromosomes changent de forme: ils se condensent et deviennent filamenteux. A un moment, la membrane nucléaire qui les entoure se rompt et des fuseaux microtubulaires se fixent sur les paires de chromosomes, les obligeant à se séparer. Cela met fin à la première division méiotique, qui donne naissance à deux spermatocytes haploïdes de deuxième ordre. Ceux-ci passent par une seconde division méiotique à l'issue de laquelle il se forme un nombre égal de chromosomes X et Y portant des spermatides.

La transformation morphologique des spermatides en spermatozoïdes s'appelle la spermiogenèse. Lorsque celle-ci est terminée, chaque cellule spermatique est libérée par les cellules de Sertoli dans la lumière du tube séminifère par un processus appelé spermiation. Le spermatozoïde migre le long du tube vers le rete testis et dans la tête de l'épididyme. Les spermatozoïdes qui quittent le tube séminifère sont immatures: ils ne sont capables ni de féconder un ovule, ni de se déplacer. Les spermatozoïdes libérés dans la lumière du tube séminifère sont en suspension dans un liquide produit essentiellement par les cellules de Sertoli. En raison de légères modifications du milieu ionique du rete testis, du sperme

concentré en suspension dans ce liquide s'écoule en permanence depuis les tubes séminifères jusque dans l'épididyme par les canaux efférents. L'épididyme est un tube unique très enroulé (5 à 6 mètres de long) dans lequel les spermatozoïdes séjournent 12 à 21 jours.

Dans l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent progressivement leur motilité et leur pouvoir fécondant, peut-être en raison d'un changement de nature du liquide contenant la suspension qui se trouve dans l'épididyme. C'est-à-dire que, au fur et à mesure que les cellules mûrissent, l'épididyme absorbe les composants du liquide contenant les sécrétions des cellules de Sertoli (la protéine liant les androgènes, par exemple), ce qui augmente la concentration en spermatozoïdes. L'épididyme apporte également ses propres sécrétions au liquide, dont la glycérylphosphorylcholine et la carnitine, qui sont des substances chimiques.

La morphologie du spermatozoïde continue de se transformer dans l'épididyme. La gouttelette cytoplasmique est éliminée et le noyau du spermatozoïde se condense encore plus. Si l'épididyme est le principal réservoir de stockage des spermatozoïdes jusqu'à l'éjaculation, environ 30% des spermatozoïdes d'un éjaculat étaient stockés dans le canal déférent. Des éjaculations fréquentes accélèrent le passage du sperme dans l'épididyme et peuvent augmenter le nombre de spermatozoïdes immatures (stériles) dans l'éjaculat (Zaneveld, 1978).

A.1-L'éjaculation

Une fois dans le canal déférent, les spermatozoïdes sont transportés par les contractions musculaires de l'éjaculation plutôt que par le flux liquidien. Au cours de l'éjaculation, des liquides sont expulsés énergiquement des glandes sexuelles annexes, produisant le plasma séminal. Ces glandes n'expulsent pas leurs sécrétions en même temps. La glande bulbo-urétrale (glande de Cowper) expulse d'abord un liquide clair, puis suivent les sécrétions prostatiques, les liquides contenant les spermatozoïdes issus de l'épididyme et de l'ampoule du canal déférent et, enfin, la plus grande partie provenant essentiellement des vésicules séminales. Le plasma séminal n'est donc pas un liquide homogène.

A.2-Les effets toxiques sur la spermatogenèse et la spermiogenèse

Des toxiques peuvent perturber la spermatogenèse à différents niveaux. Les toxiques les plus nocifs sont ceux qui détruisent ou modifient les spermatogonies, ou les cellules de Sertoli, du point de vue génétique (sans réparation possible), car leur action est irréversible. Des études chez l'animal ont permis de déterminer le stade auquel un toxique attaque le processus de spermatogenèse. Pour ces études, on soumet les animaux à une exposition de courte durée à un toxique, puis on effectue des prélèvements destinés à en déterminer les effets. En connaissant la durée de chaque stade de la spermatogenèse, il est possible d'en déduire le stade affecté.

L'analyse biochimique du plasma séminal fournit un aperçu de la fonction des glandes sexuelles annexes. Les substances chimiques sécrétées principalement par chacune de ces dernières sont généralement choisies comme marqueur pour chaque type de glande. Ainsi, l'épididyme est représenté par la glycérylphosphorylcholine, les vésicules séminales par le fructose et la prostate par le zinc. Il faut noter que ce type d'analyse ne fournit que des informations grossières sur la fonction glandulaire et peu, ou pas, d'informations sur les autres constituants sécrétoires. La mesure du pH et de l'osmolalité du sperme donne des informations générales supplémentaires sur la nature du plasma séminal.

Il est possible d'analyser le plasma séminal, à la recherche d'un toxique ou de son métabolite. Des métaux lourds y ont été détectés grâce à la spectrophotométrie par absorption atomique, tandis que des hydrocarbures halogénés ont été dosés dans le sperme par chromatographie en phase gazeuse après extraction ou filtration protéine-limitante (Stachel et coll., 1989; Zikarge, 1986).

La viabilité et la motilité des spermatozoïdes dans le plasma séminal reflètent habituellement sa qualité. Des modifications de leur viabilité, mesurée par l'absence de coloration ou le gonflement hypo-osmotique, ou de leurs paramètres de motilité pourraient évoquer des effets toxiques post-testiculaires.

L'analyse du sperme peut également indiquer si la production de cellules spermatiques a été touchée par un toxique. Le nombre et la morphologie des spermatozoïdes donnent des indications sur l'intégrité de la spermatogenèse et de la spermiogenèse. Le nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat est directement lié au nombre de cellules germinales par gramme de testicule (Zukerman et coll., 1978), tandis qu'une morphologie anormale résulte probablement d'une spermiogenèse anormale. Des spermatozoïdes morts ou immobiles reflètent souvent les effets d'événements post-testiculaires. Le type d'effet toxique ou le moment de sa survenue donne des indications sur la cible du toxique. Par exemple, l'exposition de rats mâles au 2-méthoxyéthanol a entraîné une diminution de la fécondité après quatre semaines (Chapin et coll., 1985). Ce signe, confirmé par l'examen histologique, indique que la cible de l'effet toxique est le spermatocyte (Chapin et coll., 1984). S'il n'est pas acceptable du point de vue éthique d'exposer intentionnellement des sujets humains à des produits que l'on suspecte d'être toxiques pour la reproduction, l'analyse du sperme provenant d'éjaculats en série d'hommes accidentellement exposés sur une courte durée à des toxiques potentiels peut fournir des informations similaires utiles.

L'exposition professionnelle au 1,2-dibromochloropropane (DBCP) a diminué la concentration de spermatozoïdes dans les éjaculats, la faisant passer de 79 millions de cellules/ml en moyenne chez des hommes n'ayant pas été exposés à 46 millions de cellules/ml chez des travailleurs exposés (Whorton et coll., 1979). Une fois soustraits à cette exposition, les hommes dont le nombre de spermatozoïdes avait diminué ont récupéré partiellement, tandis que ceux qui étaient azoospermiques sont restés stériles. La biopsie testiculaire a révélé que la cible du DBCP était la spermatogonie. Cela confirme la gravité de l'effet lorsque les cellules souches sont la cible des toxiques. Rien n'indiquait que l'exposition d'hommes au DBCP était associée à une issue défavorable de la grossesse (Potashnik et Abeliovich, 1985). L'étude de travailleurs exposés au dibromure d'éthylène constitue un autre exemple de toxiques ayant pour cible la spermatogenèse/spermiogenèse. Ces travailleurs avaient plus de spermatozoïdes à tête fuselée et moins de spermatozoïdes par éjaculat que les témoins (Ratcliffe et coll., 1987).

L'atteinte génétique est difficile à déceler dans le sperme humain. Plusieurs études chez l'animal utilisant le test de mutation létale dominante (Ehling et coll., 1978) indiquent que l'exposition du père peut entraîner une issue pathologique de la grossesse. Des études épidémiologiques portant sur des populations importantes ont montré une augmentation de la fréquence des avortements spontanés chez des femmes dont le mari travaillait dans la mécanique automobile (McDonald et coll., 1989). De telles études indiquent la nécessité de trouver des méthodes permettant de déceler l'atteinte génétique du sperme humain. Plusieurs laboratoires sont en train de mettre au point certaines techniques, notamment des sondes d'ADN destinées à détecter les mutations génétiques (Hecht, 1987), le caryotypage des

chromosomes des spermatozoïdes (Martin, 1983) et l'évaluation de la stabilité de l'ADN par cytométrie de flux (Evenson, 1986).

La figure 11 donne la liste des toxiques connus pour affecter la qualité du sperme et le tableau 1 présente un résumé des résultats des études épidémiologiques concernant les effets de l'exposition paternelle sur la reproduction.

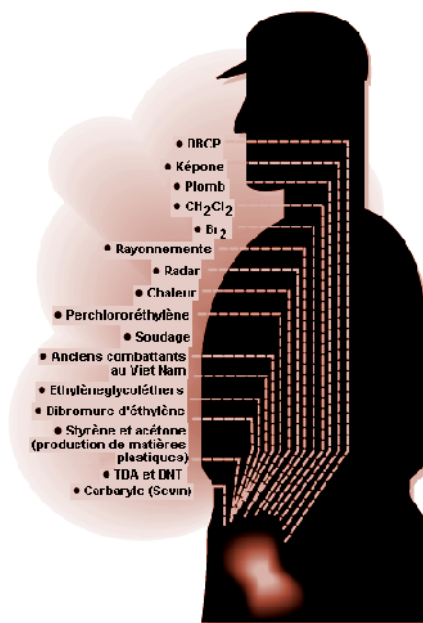


Figure 11 Expositions associées à des effets nuisant à la qualité du sperme

Tableau 1 Etudes épidémiologiques concernant les effets de l'exposition paternelle sur l'issue de la grossesse

Référence	Type d'exposition ou de profession	Association avec une exposition ¹	Effet
Etudes de populations basées sur le dossier médical			
Lindbohm et coll., 1984	Solvants	–	Avortement spontané
Lindbohm et coll., 1984	Station-service	+	Avortement spontané
Daniell et Vaughan, 1988	Solvants organiques	–	Avortement spontané
McDonald et coll., 1989	Mécanique	+	Avortement spontané
McDonald et coll., 1989	Traitement des aliments	+	Anomalies du développement
Lindbohm et coll., 1991a	Oxyde d'éthylène	+	Avortement spontané
Lindbohm et coll., 1991a	Raffinerie de pétrole	+	Avortement spontané
Lindbohm et coll., 1991a	Produits d'imprégnation du bois	+	Avortement spontané

Lindbohm et coll., 1991a	Produits chimiques utilisés dans l'industrie du caoutchouc	+	Avortement spontané
Olsen et coll., 1991	Métaux	+	Risque de cancer chez l'enfant
Olsen et coll., 1991	Machinistes	+	Risque de cancer chez l'enfant
Olsen et coll., 1991	Forgerons	+	Risque de cancer chez l'enfant
Kristensen et coll., 1993	Solvants	+	Naissance prématurée
Kristensen et coll., 1993	Plomb et solvants	+	Naissance prématurée
Kristensen et coll., 1993	Plomb	+	Mort périnatale
Kristensen et coll., 1993	Plomb	+	Morbidity des enfants de sexe masculin
Etudes cas-témoins			
Kucera, 1968	Imprimerie	(+)	Fente labiale
Kucera, 1968	Peinture	(+)	Fente palatine
Olsen, 1983	Peinture	+	Atteinte du système nerveux central
Olsen, 1983	Solvants	(+)	Atteinte du système nerveux central
Sever et coll., 1988	Rayonnements de faible intensité	+	Malformations du tube neural
Taskinen et coll., 1989	Solvants organiques	+	Avortement spontané
Taskinen et coll., 1989	Hydrocarbures aromatiques	+	Avortement spontané
Taskinen et coll., 1989	Poussière	+	Avortement spontané
Gardner et coll., 1990	Rayonnements	+	Leucémie de l'enfant
Bonde, 1992	Soudure	+	Difficultés de conception
Wilkins et Sinks, 1990	Agriculture	(+)	Tumeur cérébrale de l'enfant
Wilkins et Sinks, 1990	Construction	(+)	Tumeur cérébrale de l'enfant
Wilkins et Sinks, 1990	Traitement des aliments/du tabac	(+)	Tumeur cérébrale de l'enfant
Wilkins et Sinks, 1990	Métaux	+	Tumeur cérébrale de l'enfant
Lindbohm et coll., 1991b	Plomb	(+)	Avortement spontané
Sallmen et coll., 1992	Plomb	(+)	Malformations congénitales
Veulemans et coll., 1993	Ethylèneglycoléther	+	Anomalies du spermogramme
Chia et coll., 1992	Métaux	+	Cadmium dans le sperme

¹ Pas d'association significative; (+) association légèrement significative; + association significative

Source: d'après Taskinen, 1993.

A.3-Le système neuroendocrinien

Le fonctionnement global du système reproducteur est contrôlé par le système nerveux et les hormones produites par les glandes (système endocrinien). L'axe neuroendocrinien reproducteur de l'homme comprend essentiellement le système nerveux central, l'antéhypophyse et les testicules. Les afférences du système nerveux central et de la périphérie sont intégrées par l'hypothalamus, qui régule directement la sécrétion de gonadotrophines par l'antéhypophyse. Les gonadotrophines, à leur tour, agissent essentiellement sur les cellules de Leydig contenues dans l'interstitium et sur les cellules de Sertoli et les cellules germinales contenues dans les tubes séminifères, afin de réguler la spermatogenèse et la production d'hormones par les testicules.

A.4-L'axe hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus sécrète une neurohormone, la gonadostimuline, dans le système porte hypophysaire, qui la transporte vers l'antéhypophyse. La sécrétion pulsatile de ce décapeptide provoque la libération concomitante de l'hormone lutéinisante (LH) et, d'une manière moins synchrone et avec cinq fois moins de puissance, celle de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Bardin, 1986). Il existe des preuves convaincantes de la présence d'une hormone libératrice de la FSH particulière, bien qu'elle n'ait pas encore pu être isolée (Savy-Moore et Schwartz, 1980; Culler et Negro-Vilar, 1986). Ces hormones sont sécrétées par l'antéhypophyse. La LH agit directement sur les cellules de Leydig afin de stimuler la synthèse et la libération de testostérone, tandis que la FSH stimule l'aromaturation de la testostérone en œstradiol par les cellules de Sertoli. La stimulation gonadotrope entraîne la libération de ces hormones stéroïdiennes dans la veine spermatique.

La sécrétion de gonadotrophines, à son tour, est contrôlée par la testostérone et l'œstradiol au moyen de mécanismes de rétroaction négative. La testostérone agit principalement sur l'hypothalamus pour réguler la sécrétion de gonadostimuline et, ainsi, diminue la fréquence des pulsations libérant essentiellement la LH. D'autre part, l'œstradiol agit sur l'hypophyse afin de diminuer l'amplitude de la libération de gonadotrophines. Par ces boucles endocriniennes rétroactives, la fonction testiculaire en général, et la sécrétion de testostérone en particulier, sont maintenues relativement constantes.

A.5-L'axe hypophyso-testiculaire

La LH et la FSH sont généralement considérées comme nécessaires à une spermatogenèse normale. Il est probable que l'effet de la LH est secondaire à l'induction d'une concentration intratesticulaire élevée de testostérone. Par conséquent, la FSH de l'hypophyse et la testostérone des cellules de Leydig agissent sur les cellules de Sertoli contenues dans l'épithélium du tube séminifère afin de déclencher la spermatogenèse. La production de spermatozoïdes se poursuit, bien que quantitativement réduite, après la disparition soit de la LH (et probablement de la forte concentration intratesticulaire de testostérone), soit de la FSH. La FSH est nécessaire pour déclencher la spermatogenèse à la puberté et, dans une moindre mesure, pour relancer la spermatogenèse lorsqu'elle a été interrompue (Matsumoto, 1989; Sharpe, 1989).

La synergie hormonale qui sert à entretenir la spermatogenèse pourrait comporter le recrutement par la FSH de spermatogonies différenciées afin qu'elles entament la méiose, tandis que la testo-stérone contrôlerait des stades ultérieurs spécifiques de la spermatogenèse. La FSH et la testostérone peuvent également agir sur les cellules de Sertoli afin de stimuler la production d'un ou de plusieurs facteurs paracrines pouvant modifier le nombre de cellules de Leydig et leur production de testostérone (Sharpe, 1989). La FSH et la testostérone stimulent la synthèse de protéines par les cellules de Sertoli, notamment la synthèse de la protéine liant les androgènes (ABP), tandis que la FSH seule stimule la synthèse de l'aromatase et de l'inhibine. L'ABP, sécrétée essentiellement dans le liquide du tube séminifère, est transportée vers la partie proximale de la tête de l'épididyme, où elle sert probablement de support local pour les androgènes (Bardin, 1986). L'aromatase catalyse la conversion de la testostérone en œstradiol dans les cellules de Sertoli et dans d'autres tissus périphériques.

L'inhibine est une glycoprotéine composée de deux sous-unités différentes, a et b, liées par un pont disulfure. Si l'inhibine entrave préférentiellement la libération de FSH, elle peut également diminuer la libération de LH en présence d'une stimulation par la gonadostimuline (Kotsugi et coll., 1988). La FSH et la LH stimulent la libération d'inhibine avec sensiblement la même puissance (McLachlan et coll., 1988). Il est intéressant de noter que l'inhibine est excrétée dans le sang de la veine spermatique par des pulsations synchrones avec celles de la testostérone (Winters, 1990). Cela ne reflète probablement pas une action directe de la LH ou de la testostérone sur l'activité des cellules de Sertoli, mais plutôt les effets d'autres produits des cellules de Leydig excrétés soit dans les espaces interstitiels, soit dans la circulation.

La prolactine, également sécrétée par l'antéhypophyse, agit en synergie avec la LH et la testostérone pour activer la fonction de reproduction chez l'homme. La prolactine se fixe sur des récepteurs spécifiques portés par les cellules de Leydig et augmente la quantité du complexe récepteur d'androgènes dans le noyau des tissus sensibles aux androgènes (Baker et coll., 1977). L'hyperprolactinémie s'accompagne d'une réduction de la taille des testicules et de la prostate, du volume de sperme et de la concentration de LH et de testostérone circulante (Segal et coll., 1979). L'hyperprolactinémie a également été associée à une impuissance, apparemment non liée à une modification de la sécrétion de testostérone (Thorner et coll., 1977).

Si on mesure la quantité de métabolites des hormones stéroïdes dans l'urine, il faut tenir compte du fait que l'exposition étudiée peut en modifier le métabolisme. Cela est d'autant plus pertinent que la plupart des métabolites sont formés par le foie, cible de nombreux toxiques. Le plomb, par exemple, diminue la quantité de stéroïdes sulfatés excrétés dans l'urine (Apostoli et coll., 1989). Chez l'homme, le taux sanguin de chaque gonadotrophine s'élève au cours du sommeil au début de la puberté, tandis que la testostérone se maintient à son taux diurne pendant tout l'âge adulte (Plant, 1988). C'est pourquoi les prélèvements de sang, d'urine et de salive doivent être faits à peu près à la même heure du jour afin d'éviter des variations liées au schéma sécrétoire diurne.

Il est très vraisemblable que les effets patents de l'exposition à un toxique ayant pour cible le système neuroendocrinien reproducteur se manifestent par des modifications biologiques des androgènes. Chez l'homme adulte, les manifestations régulées de manière significative par les androgènes et pouvant être décelées au cours d'un examen physique de base sont les suivantes:

- 1) la rétention azotée et le développement musculaire;
- 2) l'état des organes génitaux externes et des organes génitaux annexes;
- 3) l'hypertrophie du larynx et l'épaississement des cordes vocales à l'origine de la voix masculine;
- 4) la croissance de la barbe et des poils axillaires et pubiens, les golfes temporaux et la calvitie;
- 5) la libido et les performances sexuelles;
- 6) la présence dans certains tissus (foie, reins, glandes salivaires) de protéines spécifiques d'organes;
- 7) un comportement agressif (Bardin, 1986). Une modification de l'un ou l'autre de ces traits peut indiquer une altération de la production d'androgènes.

A.6-Exemples d'effets des toxiques

Le plomb est un exemple classique de toxique qui atteint directement le système neuroendocrinien. Chez des hommes exposés au plomb pendant moins d'un an, la concentration sérique de LH était élevée. Cet effet n'était pas supérieur chez les hommes exposés pendant plus de cinq ans. Le taux sérique de FSH n'était pas modifié. D'autre part, le taux sérique d'ABP avait augmenté et celui de testostérone totale diminué chez les hommes exposés au plomb pendant plus de cinq ans. Le taux sérique de testostérone libre avait baissé de manière significative après une exposition au plomb de trois à cinq ans (Rodamilans et coll., 1988). En revanche, la concentration sérique de LH, de FSH, de testostérone totale, de prolactine et de 17-cétostéroïdes neutres n'était pas modifiée chez les travailleurs ayant une plombémie basse, même si la fréquence de distribution des spermatozoïdes était modifiée (Assennato et coll., 1986).

L'exposition de peintres de chantiers navals au 2-éthoxyéthanol avait entraîné une diminution du nombre de spermatozoïdes sans modification concomitante du taux sérique de LH, de FSH ou de testostérone (Welch et coll., 1988). Ainsi, des toxiques peuvent affecter séparément la production d'hormones et le taux de spermatozoïdes.

Chez des travailleurs affectés à la fabrication du DBCP, un nématocide, le taux sérique de LH et de FSH avait augmenté, tandis que le nombre de spermatozoïdes et la fécondité avaient diminué. Ces effets sont apparemment des séquelles de l'action du DBCP sur les cellules de Leydig, qui modifie la production ou l'action des androgènes (Mattison et coll., 1990).

Plusieurs composés peuvent être toxiques en raison de leur similitude structurale avec les hormones stéroïdiennes de la reproduction. C'est ainsi qu'en se fixant sur le récepteur endocrinien correspondant des toxiques peuvent se comporter en agonistes ou en antagonistes et perturber les réponses biologiques. La chlordécone (Képone), un insecticide qui se fixe sur les récepteurs œstrogéniques, avait fait diminuer le nombre et la motilité des spermatozoïdes, stoppé leur maturation et fait régresser la libido. S'il est tentant de supposer que ces effets sont dus à l'interférence de la chlordécone avec les œstrogènes au niveau neuroendocrinien ou testiculaire, les variations du taux sérique de testostérone, de LH et de FSH n'étaient pas, dans

ces études, comparables à celles obtenues à la suite d'un traitement par l'œstradiol. Le DDT et ses métabolites possédant également des propriétés stéroïdiennes, on pourrait s'attendre à ce qu'ils modifient la fonction génitale de l'homme en interférant avec les fonctions des hormones stéroïdiennes. Des xénobiotiques comme les biphényles polychlorés, les biphényles polybromés et les pesticides organochlorés peuvent également perturber les fonctions reproductrices de l'homme par une activité œstrogénique agoniste ou antagoniste (Mattison et coll., 1990).

A.7-La fonction sexuelle

On entend par fonction sexuelle humaine l'ensemble des activités intégrées des testicules et des glandes sexuelles secondaires, des systèmes de contrôle endocriniens et des composantes comportementales et psychologiques de la reproduction, basées sur le système nerveux central (libido). L'érection, l'éjaculation et l'orgasme sont trois événements physiologiques et psychodynamiques distincts et indépendants qui surviennent normalement en même temps chez l'homme.

En raison des problèmes décrits plus haut, les données fiables concernant les effets d'une exposition professionnelle sur la fonction sexuelle sont peu nombreuses. Il a été montré que les médicaments peuvent affecter chacun des trois stades de la fonction sexuelle masculine (Fabro, 1985), ce qui donne à penser qu'une exposition professionnelle peut exercer des effets similaires. Les antidépresseurs, les antagonistes de la testostérone et les stimulants de la libération de prolactine diminuent effectivement la libido chez l'homme. Les antihypertenseurs agissant sur le système nerveux sympathique provoquent une impuissance chez certains hommes, mais, chose surprenante, un priapisme chez d'autres. La phénoxybenzamine, un antagoniste des récepteurs adrénergiques, a été utilisée en clinique pour éviter l'émission du sperme sans empêcher l'orgasme (Shilon, Paz et Homonnai, 1984). Les antidépresseurs anticholinergiques permettent l'émission du sperme tout en bloquant son éjection et en empêchant l'orgasme, de sorte que le sperme suinte de l'urètre au lieu d'en être éjecté.

Les drogues douces affectent également la fonction sexuelle (Fabro, 1985). L'alcool peut diminuer l'impuissance en augmentant la libido. La cocaïne, l'héroïne et les cannabinoïdes à forte dose diminuent la libido. Les opiacés retardent ou entravent également l'éjaculation.

Le grand nombre et la grande variété des produits pharmaceutiques qui se sont avérés avoir une action sur le système reproducteur masculin viennent étayer l'idée que des produits chimiques présents sur le lieu de travail peuvent aussi être toxiques pour la reproduction. Des méthodes de recherche fiables et pratiques dans les conditions d'étude sur le terrain sont nécessaires pour évaluer ce domaine important qu'est la toxicologie de la reproduction.

B-LA STRUCTURE DU SYSTÈME REPRODUCTEUR FÉMININ ET LA VULNÉRABILITÉ DES ORGANES CIBLES

L'appareil reproducteur féminin est contrôlé par des éléments du système nerveux central, notamment l'hypothalamus et l'hypophyse. Il se compose des ovaires, des trompes de Fallope, de l'utérus et du vagin (voir figure 12). Les ovaires, gonades féminines, sont la source des ovocytes; ils synthétisent et sécrètent également les principales hormones sexuelles féminines: œstrogènes et progestérone. Les trompes de Fallope amènent les ovocytes vers l'utérus et permettent aux spermatozoïdes d'en sortir. L'utérus est un organe musculaire en

forme de poire, dont la partie supérieure communique, par les trompes de Fallope, avec la cavité abdominale et la partie inférieure, par l'étroit canal du col, avec le vagin et, de là, avec l'extérieur. Le tableau 2 présente les composés, ainsi que les manifestations cliniques, le site et les mécanismes d'action des produits potentiellement toxiques pour la reproduction.

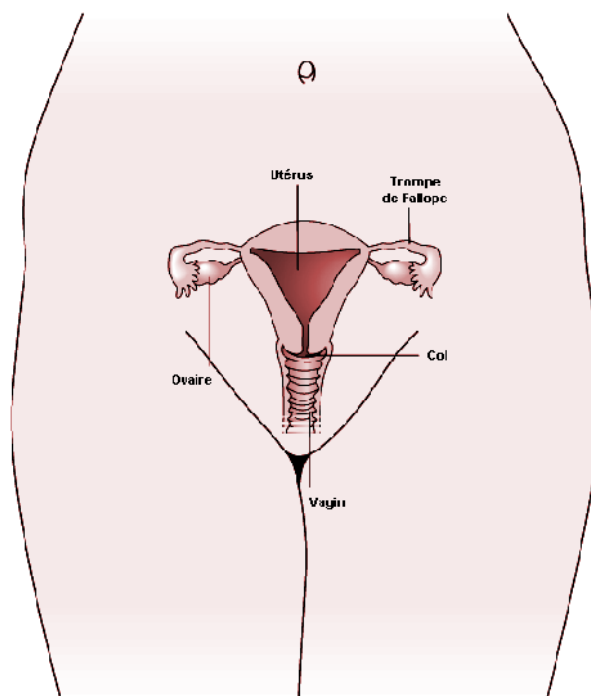


Figure 12 L'appareil reproducteur féminin

Tableau 2 Produits potentiellement toxiques pour la reproduction chez la femme

Produit	Manifestation clinique	Site	Mécanisme/cible
Réactivité chimique			
Agents alkylants	Troubles des règles Aménorrhée Atrophie ovarienne Baisse de la fécondité Ménopause prématurée	Ovaire Utérus	Toxicité pour les cellules de la granulosa Toxicité pour les ovocytes Toxicité pour les cellules de l'endomètre
Plomb	Troubles des règles Atrophie ovarienne Baisse de la fécondité	Hypothalamus Hypophyse Ovaire	Diminution du taux de FSH Diminution du taux de progestérone
Mercure	Troubles des règles	Hypothalamus Ovaire	Modification de la production et de la sécrétion de gonadotrophines Toxicité folliculaire Prolifération des cellules de la granulosa

Cadmium	Atrésie folliculaire Diœstrus persistant	Ovaire Hypophyse Hypothalamus	Toxicité vasculaire Toxicité pour les cellules de la granulosa Cytotoxicité
Similarité structurale			
Azathioprine	Réduction du nombre de follicules	Ovaire Ovogenèse	Analogue de la purine Perturbation de la synthèse de l'ADN/ARN
Chlordécone	Baisse de la fécondité	Hypothalamus	Agoniste des œstrogènes
DDT	Troubles des règles	Hypophyse	Perturbation de FSH, LH
2,4-D	Stérilité		
Lindane	Aménorrhée		
Toxaphène	Hyperménorrhée		
BPC, BPB	Troubles des règles		Perturbation de FSH, LH

Source: d'après Plowchalk, Meadows et Mattison, 1992. Ce sont essentiellement des tests de toxicité chez l'animal qui laissent supposer que ces produits sont des toxiques agissant directement sur la reproduction.

B.1-L'hypothalamus et l'hypophyse

L'hypothalamus est situé dans le diencephale, qui se trouve au sommet du tronc cérébral, entre les hémisphères cérébraux. C'est le principal intermédiaire entre les systèmes nerveux et endocrinien, qui sont les deux grands systèmes de contrôle du corps. Il régule l'hypophyse et la production d'hormones.

Les mécanismes par lesquels un produit chimique peut perturber la fonction reproductrice de l'hypothalamus sont, de façon générale, tous les événements susceptibles de modifier la production pulsatile de gonadostimuline. Cela peut impliquer une modification de la fréquence ou de l'amplitude des pulsations de gonadostimuline. Les processus sensibles à une agression chimique sont ceux participant à la synthèse et à la sécrétion de gonadostimuline, plus spécifiquement la transcription ou la traduction, l'encapsulation ou le transport axonal, ainsi que les mécanismes sécrétoires. Ces processus représentent des sites au niveau desquels des composés chimiquement réactifs agissant directement peuvent interférer avec la synthèse ou la libération hypothalamique de gonadostimuline. Une modification de la fréquence ou de l'amplitude des pulsations de gonadostimuline pourrait être due à la perturbation des voies stimulatrices ou inhibitrices qui en régulent la libération. Des études sur la régulation du générateur de pulsations de gonadostimuline ont montré que les catécholamines, la dopamine, la sérotonine, l'acide gamma-aminobutyrique et les endorphines sont tous susceptibles, dans une certaine mesure, de modifier la libération de gonadostimuline. Par conséquent, des xéno-biotiques agonistes ou antagonistes de ces composés pourraient modifier la libération de gonadostimuline, perturbant ainsi la communication avec l'hypophyse.

La prolactine, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) sont trois hormones protéiniques sécrétées par l'antéhypophyse qui sont essentielles à la reproduction. Elles jouent un rôle fondamental dans l'entretien du cycle ovarien en dirigeant le recrutement et la maturation folliculaires, la stéroïdogénèse, l'achèvement de la maturation des ovules, l'ovulation et la lutéinisation.

Le contrôle exact du système reproducteur, réglé avec précision, est assuré par l'antéhypophyse en réponse à des signaux de rétroaction positive et négative provenant des gonades. La libération adéquate de FSH et de LH au cours du cycle ovarien contrôle le développement folliculaire normal; l'absence de ces hormones entraîne une aménorrhée et une atrophie des gonades. Les gonadotrophines jouent un rôle déterminant par le fait qu'elles provoquent des modifications morphologiques des follicules ovariens et de leur micro-environnement stéroïdien en stimulant la production de stéroïdes et en induisant des populations de récepteurs. Une libération opportune et adéquate de ces gonadotrophines est également essentielle à l'ovulation et à une phase lutéale correcte. Etant donné que les gonadotrophines sont essentielles à la fonction ovarienne, une modification de leur synthèse, de leur stockage ou de leur sécrétion peut compromettre sérieusement la capacité de reproduction. Une interférence avec l'expression génique, que ce soit dans la transcription ou dans la traduction, au cours d'événements post-traductionnels, de l'encapsulation ou des mécanismes sécrétoires, risque de modifier le taux de gonadotrophines atteignant les gonades. Des produits chimiques agissant par le biais d'une similarité structurale ou d'une modification de l'homéostasie endocrinienne pourraient avoir des effets en interférant avec les mécanismes de rétroaction normaux. Des agonistes et des antagonistes des récepteurs stéroïdiens pourraient amorcer une libération inappropriée de gonadotrophines par l'hypophyse, ce qui provoquerait la production d'enzymes métabolisant les stéroïdes et diminuerait la demi-vie des stéroïdes et, par conséquent, le taux circulant de stéroïdes atteignant l'hypophyse.

B.2-L'ovaire

Chez les primates, l'ovaire est responsable du contrôle de la reproduction par le biais de ses principaux produits, les ovocytes et les hormones stéroïdiennes et protéiniques. La folliculogénèse, qui implique des mécanismes de régulation à la fois intra- et extra-ovariens, est le processus de production des ovocytes et des hormones. L'ovaire lui-même se compose de trois sous-unités fonctionnelles: le follicule, l'ovocyte et le corps jaune. Au cours du cycle menstruel normal, ces composants, sous l'influence de la FSH et de la LH, fonctionnent de concert afin de produire un ovule viable pour la fécondation, ainsi qu'un milieu convenable pour l'implantation et la gestation qui s'ensuit.

Durant la période préovulatoire du cycle menstruel, la mobilisation et le développement des follicules ont lieu sous l'influence de la FSH et de la LH. Cette dernière stimule la production d'androgènes par les cellules thécales, tandis que la première entraîne l'aromatisation des androgènes en œstrogènes par les cellules de la granulosa et la production d'une hormone protéinique, l'inhibine. Celle-ci, au niveau de l'antéhypophyse, diminue la libération de FSH, ce qui empêche une stimulation excessive du développement des follicules, tout en permettant la poursuite du développement du follicule dominant destiné à l'ovulation. La production d'œstrogènes augmente, stimulant à la fois la poussée de LH (aboutissant à l'ovulation) et les modifications cellulaires et sécrétoires survenant dans le vagin, le col, l'utérus et les trompes de Fallope, qui accroissent la viabilité et le transport des spermatozoïdes.

Au cours de la phase postovulatoire, les cellules thécales et de la granulosa restant dans la cavité folliculaire de l'ovocyte de premier ordre ovulé forment le corps jaune et sécrètent de la progestérone. Cette hormone stimule l'utérus afin de fournir un environnement convenable pour l'implantation de l'embryon en cas de fécondation. A l'inverse de la gonade mâle, la gonade femelle possède un nombre fini de cellules germinales à la naissance; elle est donc particulièrement sensible aux produits toxiques pour la reproduction. Une exposition de la femme à ces produits risque de diminuer la fécondité, d'augmenter les avortements spontanés et d'aboutir à une ménopause précoce ou à la stérilité.

En tant qu'unité reproductrice de base de l'ovaire, le follicule fournit le délicat milieu hormonal nécessaire à la croissance et à la maturation d'un ovocyte. Comme nous l'avons noté précédemment, ce processus complexe, appelé folliculogénèse, implique une régulation à la fois intra- et extra-ovarienne. De nombreuses modifications morphologiques et biochimiques se produisent lorsqu'un follicule primordial se transforme en follicule préovulatoire (contenant un ovocyte en cours de développement), et chaque stade du développement folliculaire possède un schéma caractéristique de sensibilité aux gonadotrophines, de production de stéroïdes et de voies de rétroaction. Ces caractéristiques semblent indiquer qu'un certain nombre de sites sont disponibles pour une interaction avec des xénobiotiques. Par ailleurs, il existe dans l'ovaire diverses populations de follicules, ce qui complique encore la situation en entraînant une toxicité folliculaire différentielle. Cela crée une situation dans laquelle les schémas de stérilité induits par un produit chimique dépendent du type de follicule atteint. Par exemple, un effet toxique pour des follicules primordiaux ne donne pas de signes immédiats de stérilité, mais va finalement diminuer la durée de la période d'activité reproductrice. En revanche, un effet toxique pour les follicules antraux ou préovulatoires entraînera l'arrêt immédiat de la fonction reproductrice. Le complexe folliculaire se compose de trois éléments de base: les cellules de la granulosa, les cellules thécales et l'ovocyte. Chacun de ces composants possède des caractéristiques qui lui confèrent une sensibilité particulière à une agression chimique.

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à une méthodologie destinée à détecter les xénobiotiques toxiques pour la granulosa en mesurant les effets sur la production de progestérone par les cellules de la granulosa en culture. L'œstradiol interrompt la production de progestérone par les cellules de la granulosa, phénomène qui a été utilisé pour étudier la réactivité de ces dernières. Le p,p'-DDT, un pesticide, et son isomère o,p'-DDT arrêtent la production de progestérone avec une puissance apparemment égale à celle de l'œstradiol. En revanche, le malathion, le parathion et la dieldrine, d'autres pesticides, ainsi que l'hexachlorobenzène, un fongicide, sont sans effet. Une nouvelle analyse détaillée de la réaction aux xénobiotiques des cellules de la granulosa isolées est nécessaire afin de définir l'utilité de cette méthode d'essai. L'attrait de ces systèmes isolés réside dans le fait qu'ils sont bon marché et faciles à utiliser; toutefois, il ne faut pas oublier que les cellules de la granulosa ne représentent qu'un composant du système reproducteur.

Les cellules thécales fournissent des précurseurs des stéroïdes synthétisés par les cellules de la granulosa. On pense qu'elles sont recrutées dans les cellules du stroma ovarien au cours de la formation et du développement des follicules. Leur recrutement peut impliquer une prolifération cellulaire du stroma aussi bien qu'une migration vers les zones entourant le follicule. Les xénobiotiques qui entravent la prolifération, la migration et la communication cellulaires ont un impact sur la fonction cellulaire thécale. Ceux qui modifient la production thécale d'androgènes peuvent aussi entraver la fonction folliculaire. Par exemple, les androgènes métabolisés en œstrogènes par les cellules de la granulosa proviennent des

cellules thécales. Il est probable qu'une modification de la production d'androgènes par les cellules thécales, qu'il s'agisse d'une augmentation ou d'une diminution, aura un effet significatif sur la fonction folliculaire. On suppose notamment qu'une production trop importante d'androgènes par les cellules thécales aboutit à une atresie folliculaire. De plus, une atteinte à la production d'androgènes par les cellules thécales peut entraîner une diminution de la production d'œstrogènes par les cellules de la granulosa. Il est clair que dans les deux cas il y aura un impact sur la reproduction. On sait peu de choses actuellement sur la vulnérabilité des cellules thécales aux xénobiotiques.

Bien qu'il existe peu d'informations sur la vulnérabilité des cellules ovariennes aux xénobiotiques, certaines données démontrent clairement que les ovocytes peuvent être altérés ou détruits par de tels produits. Les agents alkylants détruisent les ovocytes chez la femme et chez les animaux de laboratoire. Le plomb est toxique pour l'ovaire. Le mercure et le cadmium provoquent également des lésions de l'ovaire, peut-être par le biais d'une action toxique sur l'ovocyte.

B.3-De la fécondation à l'implantation

La gamétogenèse, la libération et l'union de cellules germinales mâles et femelles sont des événements préliminaires aboutissant à un zygote. Les spermatozoïdes déposés dans le vagin doivent traverser le col, puis remonter l'utérus et la trompe de Fallope pour rencontrer l'ovule. La pénétration du spermatozoïde dans l'ovule et la fusion de leurs ADN respectifs constituent le processus de fécondation. Après la fécondation, la division cellulaire s'amorce et elle se poursuit au cours des trois ou quatre jours suivants, formant un amas cellulaire compact appelé morula. Les cellules de la morula continuent à se diviser et, au moment où l'embryon en cours de développement atteint l'utérus, c'est une boule creuse appelée blastocyte.

Après la fécondation, l'embryon migre par la trompe de Fallope vers l'utérus. Le blastocyte pénètre dans celui-ci et s'implante dans l'endomètre sept jours environ après l'ovulation. A ce moment, l'endomètre est en phase postovulatoire. Une fois implanté, le blastocyte peut absorber des éléments nutritifs ou des toxiques amenés par les glandes et les vaisseaux sanguins de l'endomètre.

III-Epidémiologie de la reproduction.

A-Études épidémiologiques BPA

Peu d'études épidémiologiques ont évalué, à court et à long terme, les effets d'une exposition au bisphénol A sur la fonction de reproduction.

Une étude menée en Chine entre 2004 et 2008 a montré, chez des travailleurs fabriquant des produits à base de bisphénol A, que cette exposition au BPA (environ 50 fois plus élevée qu'en population générale) était associée à une augmentation des troubles déclarés de leur fonction sexuelle (trouble de l'érection, insatisfaction sexuelle). Une seconde publication des mêmes auteurs suggère qu'une association pourrait exister chez des travailleurs non exposés à leur poste de travail entre des niveaux de BPA comparables à ceux de la population générale et l'expression d'une « insatisfaction sexuelle ».

En 2010, deux études ont rapporté chez des hommes consultant pour infertilité ou partenaires de femmes enceintes, des modifications du taux des hormones impliquées dans la reproduction en association avec des niveaux urinaires plus élevés de bisphénol A.

Deux études ont montré une diminution de la concentration spermatique en association avec les taux urinaires de bisphénol A, taux correspondant à ceux rencontrés en population générale. Une autre étude réalisée chez des hommes féconds n'a pas trouvé d'association. Aucune étude longitudinale n'a encore été conduite sur la question, et il n'y a pas non plus de donnée humaine concernant l'impact de l'exposition au bisphénol A durant la vie intra-utérine sur la fonction de reproduction à l'âge adulte. Au total, très peu d'études ont été réalisées et on ne peut pas considérer que le bisphénol A, aux doses auxquelles la population générale est exposée, soit sans danger pour le versant masculin de la fonction de reproduction.

À l'heure actuelle, les études réalisées chez la femme sur le risque de cancer du sein ou d'endométriose reposent toutes sur une approche rétrospective (particulièrement limitée pour un composé non persistant comme le bisphénol A) et des populations cliniques de convenance, sans plan d'échantillonnage précis et ne sont donc pas informatives.

A.1-Études chez l'animal

Les deux principales études de toxicité menées chez le rat et la souris selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) n'ont pas mis en évidence d'effets significatifs sur la reproduction chez les mâles, les femelles et leur descendance, après une exposition au bisphénol A dès la gestation et sur plusieurs générations, à des doses comparables à une exposition environnementale chez l'homme (entre 3 µg/kg/j et 300 mg/kg/j).

Cependant, au cours des dernières années, plusieurs travaux réalisés dans des laboratoires de recherche académiques sur différentes souches de rats et de souris, et à partir de protocoles expérimentaux diversifiés, ont attiré l'attention sur des effets peu étudiés jusqu'alors et surtout sur des périodes d'exposition particulières. Ces études mettent l'accent sur les conséquences d'une exposition au bisphénol A *in utero* et pendant la lactation, susceptible d'interférer directement avec le développement de l'embryon, puis du nouveau-né et d'engendrer des effets à long terme sur la reproduction du jeune et de l'adulte (mâle ou femelle).

Chez le rat et la souris mâle, après exposition pendant la gestation et la période postnatale, plusieurs études révèlent des effets du bisphénol A sur l'appareil génital (hypotrophie testiculaire, hypertrophie prostatique, distance anogénitale plus courte, retard à la séparation du prépuce...), sur la production de spermatozoïdes, sur le taux des hormones mâles et sur la fertilité (diminution de la taille des portées...) avec des doses de l'ordre de quelques µg/kg/j. Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans toutes les études.

Chez le rat et la souris femelle après exposition pendant la gestation et la période postnatale, le bisphénol A peut induire une puberté précoce, des altérations de l'utérus, du vagin, de l'ovaire, de l'endomètre (effets apparaissant pour des doses variant de 0,2 à 500 µg/kg/j selon les espèces et lignées utilisées).

Par ailleurs, après une exposition *in utero*, des anomalies du comportement maternel et du comportement sexuel sont observées dans les deux sexes.

La transmission à la descendance de certains de ces effets chez les rongeurs exposés suggère que le bisphénol A peut induire des altérations de l'information épigénétique et perturber l'expression de gènes. Ces études posent le problème de la transmission des effets délétères aux générations suivantes.

Ceci justifie que les études longitudinales soient poursuivies sur plusieurs générations.

Enfin, les études réalisées dans plusieurs lignées d'une même espèce de rongeurs, montrent des variabilités intra espèce (et inter individu) de réponse au bisphénol A. Ces variabilités sont le reflet du polymorphisme génétique et pourraient également être attribuées à des expositions antérieures subies au cours des différentes phases de la vie. Le fait que les altérations ne soient pas retrouvées dans toutes les études et la mise en évidence de sensibilité variable de certaines lignées ne peut pas constituer des arguments en faveur de l'absence d'effets ; ceci doit inciter à comprendre comment des facteurs génétiques et environnementaux peuvent moduler la réponse au bisphénol A.

Chez les vertébrés aquatiques, le BPA peut modifier l'action des hormones sexuelles et provoquer des inversions partielles du sexe ainsi que des anomalies du développement embryonnaire, à des doses compatibles avec les quantités retrouvées dans certaines rivières.

A.2-Organes et tissus cibles

L'exposition au bisphénol A pendant la phase de constitution des organes au cours de la gestation semble particulièrement critique.

Pour l'appareil reproducteur femelle, l'exposition au BPA pendant la phase de constitution du tissu mammaire *in utero* peut modifier le développement de cet organe (à des doses de 0,25 µg/kg/j), augmenter sa sensibilité aux œstrogènes durant la puberté et conduire à l'apparition de lésions précancéreuses (à des doses de 25 ou 250 µg/kg/j).

De même, la période fœtale ou néonatale semble constituer une période critique au cours de laquelle une exposition au bisphénol A pourrait altérer le développement de la prostate et favoriser l'apparition de lésions précancéreuses (avec des doses de 10 à 20 µg/kg/j).

La survenue de cancers hormonodépendants (sein ou prostate), de type carcinome semble être favorisée par une altération, due au BPA, dans le développement de l'organe.

Le risque tumoral serait ensuite accru par une exposition à l'âge adulte aux hormones ou à des cancérogènes environnementaux.

Un lien entre une exposition au bisphénol A *in utero* et des lésions de l'endomètre (de type endométriose) est suspecté.

B-Études épidémiologiques Phtalates

Quatre études se sont intéressées aux anomalies du nouveau-né et de l'enfant en recherchant une exposition pendant la gestation et au cours des premiers mois de vie.

Pour la première fois en 2008, une étude a montré une relation entre les taux les plus élevés de métabolites (MEP, MBP, MEHP) ainsi que des métabolites oxydés (MEHHP, MEOHP) chez

les mères à 29 semaines de gestation (en moyenne) et une « distance anogénitale » (mesurée entre le centre de l'anus et la base du pénis) plus courte chez les nourrissons mâles. Concernant les anomalies de l'appareil génital du petit garçon (hypospadias, cryptorchidie), très peu d'études avec un nombre suffisant de cas ont été réalisées et ne permettent pas de conclure à l'existence d'un rôle des phtalates sur la survenue de ces troubles.

Chez les fillettes, un effet sur la puberté précoce a été analysé et les résultats des études ne sont pas concluants.

Chez l'homme adulte, plusieurs études transversales retrouvent un lien entre les concentrations de métabolites urinaires des phtalates et une altération des paramètres du sperme parmi lesquels la concentration et la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Deux études ne mettent pas en évidence de relation entre les concentrations urinaires en phtalates et les paramètres du sperme. Par ailleurs, une étude de type exposé/non exposé met en évidence une relation entre les concentrations plus élevées de métabolites urinaires en phtalates et les concentrations basses de testostérone.

Chez les femmes, peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates sur la santé reproductive. Seul le risque d'endométriose a été spécifiquement évalué et les preuves apportées par ces quelques études de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose sont insuffisantes. Les effets de l'exposition aux phtalates sur la fonction ovulatoire et certains niveaux hormonaux (œstradiol, progestérone, LH, FSH) suggérés dans les études animales ne sont pas relatés chez la femme.

L'évaluation des effets des phtalates est rendue complexe du fait de la diversité au niveau des études, des populations étudiées, de la méthodologie des dosages et des limites de détection ainsi que des paramètres phénotypiques pris en compte.

B.1-Études chez l'animal mâle

Les études de références ayant servi à la détermination de la DJT pour le DEHP et le DBP ont été conduites dans trois lignées de rat (Sprague-Dawley, Wistar, Fisher). Les expositions ont été effectuées pendant la gestation et/ou la période néonatale ou encore sur plusieurs générations. Une atteinte testiculaire et des pathologies des organes sexuels mâles accessoires tels que vésicules séminales, prostate, épидидyme ont été rapportées à différents stades du développement. De nombreuses études rapportent une baisse du poids de la prostate, une diminution de la distance anogénitale, une augmentation des hypospadias ou cryptorchidies, une rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons, une diminution de la longueur du pénis... Les effets sont signalés aux doses de DEHP et de DBP de 150 et 500 mg/kg/j.

Les mêmes effets peuvent être obtenus à des doses plus faibles (100 mg) en présence des deux phtalates. Par ailleurs, il semble que certaines lignées de rat puissent être sensibles à des doses de 10 à 100 mg/kg/j.

Des modifications des caractéristiques spermatiques (taux de spermatozoïdes, morphologie) et des altérations des taux d'hormones (testostérone, LH...) sont observées après exposition au DEHP et au DPB (doses supérieures à 100 mg/kg/j) chez le rat ou le lapin. Le DBP réduit la production de testostérone fœtale, mais cet effet disparaît rapidement après l'arrêt du gavage. La plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale

montre qu'à l'âge adulte les taux plasmatiques de testostérone des mâles traités *in utero* sont comparables à ceux d'animaux non exposés. Une baisse de la fertilité n'est rapportée que pour des doses élevées (doses supérieures à 500 mg/kg/j).

Chez le singe mâle (marmouset, cynomolgus), ces effets sont retrouvés après exposition à ces deux phtalates (aux mêmes doses) mais de manière moins évidente que chez le rat.

B.2-Organes et tissus cibles chez le mâle

La très grande majorité des études chez le rat, réalisées par gavage durant la gestation, rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule fœtal : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales. Les travaux signalent de manière cohérente une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'INSL3 de ces cellules pendant la vie fœtale ce qui conduit à inhiber la masculinisation ou le développement des organes reproducteurs androgéno-dépendants. Cet effet n'est pas observé chez la souris. Concernant les cellules de Sertoli, leur nombre et leur prolifération peuvent être inhibés transitoirement lors d'une exposition *in utero* chez le rat sans que l'on sache s'il s'agit d'un effet direct ou indirect via l'inhibition de la synthèse d'androgène.

Concernant les cellules germinales fœtales, on observe l'apparition de cellules multinucléées chez le rat et la souris après une exposition *in utero* avec le DEHP et le DPB. Le DEHP augmente également l'apoptose de ces cellules. Ce dernier effet est décrit chez le rat et également retrouvé dans les cultures organotypiques de testicule fœtal humain et murin.

Chez le singe (marmouset) comme chez le rat, un retard de différenciation des cellules germinales fœtales a été rapporté mais aucun effet notable sur la prolifération des cellules de Sertoli n'est décrit.

B.3-Études chez l'animal femelle

Peu d'études se sont intéressées aux effets des phtalates sur l'appareil reproducteur des animaux femelles.

Chez le rat femelle, après exposition *in utero* et néonatale au DEHP, on observe une puberté avancée ou retardée selon le moment d'administration (pour des doses de 15 ou 150 mg/kg/j) et des modifications des taux d'hormones (œstradiol, progestérone). Une réduction de la fertilité est rapportée avec le DBP après une exposition à partir du sevrage (500 mg/kg/j).

Chez les femelles marmouset exposées au DEHP juste après le sevrage (3 mois) et jusqu'à la maturité sexuelle (18 mois), les analyses morphologiques du tractus génital femelle révèlent une augmentation du poids des ovaires et de l'utérus aux doses élevées ainsi qu'une augmentation des niveaux d'œstradiol circulant. En revanche, aucun changement significatif n'est observé en histologie dans les utérus et ovaires, si ce n'est un nombre un peu plus élevé de corps jaunes.

L'augmentation des niveaux d'œstradiol observée chez le rat comme chez le marmouset pourrait être à l'origine de l'atrophie folliculaire décrite dans l'ovaire.

B.4-Organes et tissus cibles chez la femelle

Les données chez l'animal femelle indiquent que l'ovaire est un organe cible de l'action des phtalates (DEHP, DBP). Les études *in vitro* montrent clairement une diminution de la production d'œstradiol par les cellules folliculaires ovariennes suite à l'exposition au DEHP et son principal métabolite le MEHP.

L'aromatase (enzyme qui convertit la testostérone en œstradiol) pourrait être une cible directe du DEHP.

D'autres organes que l'ovaire sont également des cibles potentielles comme l'hypophyse ou l'hypothalamus au niveau cérébral ou encore l'utérus et la glande mammaire comme en témoignent quelques études *in vitro*.

B.5-Études chez les poissons

Chez le poisson zèbre (zebrafish) mâle, une exposition au DEHP induit une réduction du succès de fécondation d'œufs pondus par des femelles non traitées et des anomalies de la spermatogénèse (suggérant que la progression de la méiose pourrait être perturbée). D'autres effets sont fréquemment observés après un traitement au BBP : une altération de la qualité (mobilité, forme) des spermatozoïdes, une faible quantité d'ovotestis (gonade comprenant à la fois des aspects de testicule et d'ovaire), des anomalies histologiques de la gonade mâle, des anomalies de la différenciation des testicules.

Chez le zebrafish femelle, les effets observés après traitement par le DEHP sont plus évidents que ceux décrits chez le mâle : diminution forte du nombre d'ovocytes matures, altération de la croissance des ovocytes, de leur maturation, de l'ovulation elle-même et plus généralement de la capacité à produire des embryons.

D-Études épidémiologiques polybromés

Les seuls composés bromés analysés sont les PBDE. L'étude de la cohorte mère-enfant finlandaise et danoise rapporte une relation entre cryptorchidie observée chez les nouveau-nés et 7 composés de la famille des PBDE mesurés dans le lait maternel recueilli entre 1 et 3 mois. Les auteurs indiquent également une augmentation des taux de l'hormone luthéinisante (LH). Dans une autre cohorte mère-enfant en Californie, une augmentation du délai pour concevoir a été notée chez certaines femmes en relation avec les taux sanguins plus élevés de PBDE. Cependant, ces études sont encore trop peu nombreuses pour constituer une preuve suffisante d'un rôle des PBDE sur la santé reproductive de l'homme et de la femme. Aucune étude n'a pris en considération les expositions à d'autres retardateurs de flamme polybromés (HBCD et TBBPA).

D.1-Études chez l'animal

Les études animales disponibles sont très peu nombreuses et la plupart proviennent du même laboratoire.

Chez le rat mâle, avec les composés BDE 99 et 209 (500 et 1500 mg/kg/jour) après exposition *in utero*, des anomalies ont été observées : diminution de la distance anogénitale, altération de

la production spermatique et de certains paramètres fonctionnels spermatiques, diminution des taux de testostérone.

Chez le rat femelle, une diminution du nombre de follicules ovariens a été rapportée avec ces mêmes composés. Les doses utilisées (1 à 10 mg/kg en sous-cutané) sont cependant très supérieures aux expositions estimées chez l'homme.

D.2-Organes et tissus cibles

Chez la femelle, l'ovaire est un organe cible. Sur une culture de cellules isolées de truie (ou en co-culture), en présence d'un mélange de PBDE, il est montré, une modification stable après 48 h des taux de testostérone et progestérone susceptibles d'engendrer une lutéinisation prématurée des follicules préovulatoires. Après une exposition chronique des rates à HBCD (140 mg/kg/ jour), une étude rapporte, à l'examen histologique des ovaires, une diminution d'un tiers des follicules primordiaux constituant la réserve des follicules de l'ovaire.

Une diminution du nombre de follicules primordiaux est considérée comme un biomarqueur des effets adverses sur la reproduction femelle, car non réversible. Cependant, ces animaux femelles ont un nombre normal d'implantations au cours de leur première gestation. Une étude sur une période plus longue de la vie de l'animal permettrait de voir si la diminution de la réserve folliculaire entraîne une insuffisance ovarienne précoce.

Chez le mâle, l'organe cible est le testicule. Chez la souris, l'exposition au BDE 209 (500 et 1 500 mg/kg/jour) entraîne une modification du potentiel membranaire mitochondrial des spermatozoïdes épидидymaires et de l'amplitude de déplacement latéral de la tête suggérant un stress oxydatif. Des études *in vitro* avec TBBPA sur les cellules de Sertoli de souris ont montré une mort cellulaire en partie par apoptose, impliquant une dépolarisation mitochondriale Ca^{2+} dépendante. Ces effets se produisent à des concentrations environ

100 fois plus élevées que les plus hauts niveaux de TBBPA mesurés chez l'homme.

C-Études épidémiologiques Composés perfluorés

Le nombre d'études concernant les effets potentiels du PFOA et du PFOS sur la fonction de reproduction humaine est très limité. Une étude réalisée sur une cohorte de naissance danoise rapporte une association entre les taux plasmatiques de PFOS et PFOA et la fertilité des couples (augmentation du risque d'infécondité involontaire). Une autre étude danoise suggère un lien entre les taux cumulés de PFOS et PFOA et une modification de la morphologie spermatique.

C.1-Études chez l'animal

Des études menées sur deux générations indiquent que, même à de très fortes doses, le PFOA ne modifie pas la fertilité des rats mâles. Il s'agit de doses 30 000 fois plus fortes que les concentrations mesurées chez l'être humain. Il n'a pas été rapporté d'effet néfaste du PFOA ou PFOS sur la production spermatique des rongeurs. Il faut souligner les différences inter-espèces pour les durées de demi-vie et le métabolisme en particulier entre l'homme et les rongeurs.

Chez le rat, deux études concernant le PFDoA (acide perfluorododécanoïque) administré par gavage indiquent une diminution de la production de testostérone (avec réduction de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse de la testostérone) dès la dose de 0,2 mg/kg/j. Plus de 40 protéines (impliquées dans le stress oxydatif et la chaîne respiratoire mitochondriale) sont modifiées dans les testicules de rats traités de manière chronique.

Les composés perfluorés (PFOA et PFOS) ne semblent pas modifier la fertilité femelle ou la morphologie ovarienne mais peuvent altérer la stéroïdogénèse ovarienne. Chez la souris, on observe un retard de la maturité sexuelle des femelles traitées (10 mg/kg/jour) *in utero* : l'âge de l'ouverture vaginale et celui du premier œstrus est retardé. Un effet sur la régularité des cycles oestriens est rapporté avec le PFOS (1 à 10 mg/kg/jour) administré à des rates adultes. Ces effets apparaissent variables en fonction de l'espèce (rat ou souris).

C.2-Organes et tissus cibles

Dans le testicule de rat adulte après traitement par le PFDoA, la diminution de la production de testostérone est associée à une augmentation de l'apoptose dans les différents types de cellules.

Chez la souris, plusieurs travaux montrent des effets du PFOA sur le développement ou la différenciation de la glande mammaire (augmentation du nombre de bourgeons terminaux). Ceci serait en relation avec l'augmentation de la synthèse de la progestérone ovarienne sous l'effet du PFOA. Des différences selon les lignées de souris sont rapportées.

D'une façon générale, les effets des composés perfluorés dépendent de leur structure chimique et varient selon l'espèce (rat, souris) ou la lignée.

Chez le vairon mâle adulte, une augmentation de la vitellogénine a été observée après traitement au PFOA. Des signes d'ovotestis ont également été observés, ce qui suggère clairement une activité œstrogénique. Chez les femelles traitées par du PFOS, une étude décrit une diminution de la croissance de la gonade et une altération du développement des embryons pondus par ces femelles. Par ailleurs, le PFOS induit des anomalies histologiques des ovaires chez les femelles traitées.

D-Études épidémiologiques Parabènes

En ce qui concerne le butyl parabène, une étude menée chez une centaine d'hommes consultant pour infertilité a montré que sa présence dans le sérum est significativement associée aux altérations de l'ADN des spermatozoïdes. Une relation dose dépendante est observée avec l'augmentation de la fragmentation de l'ADN. Cependant, les données épidémiologiques sont insuffisantes pour confirmer l'impact des parabènes sur la qualité spermatique.

En 2004, la mise en évidence des cinq parabènes les plus utilisés (méthyl, éthyl, n-propyl, n-butyl et isobutyl parabènes) dans la graisse de carcinomes mammaires a déclenché un débat scientifique et sociétal concernant l'effet possible de certains composés de la famille des parabènes utilisés en application cutanée locale sous les aisselles (notamment du fait de leur présence dans les déodorants) sur le risque de survenue de cancer du sein. Cette étude a été critiquée du fait qu'elle comportait peu d'échantillons et pas de témoins.

Par ailleurs, deux études épidémiologiques (2002, 2003) n'apportent pas d'éléments concernant l'impact possible des parabènes présents dans les déodorants ou anti-transpirants sur la survenue de cancer du sein. La première, une étude cas-témoins, ne rapporte aucune augmentation du risque associé à l'usage de déodorants/antitranspirants. La seconde constate seulement chez les femmes ayant un cancer du sein, une relation entre l'âge de survenue de ce cancer et la précocité de l'utilisation des déodorants/antitranspirants (associée au rasage).

Aujourd'hui, les résultats disponibles ne sont donc pas en mesure de répondre à la question.

D.1-Études chez l'animal

Concernant le méthyl parabène, une étude menée par un consortium industriel a confirmé récemment l'absence d'effet sur les organes reproducteurs mâles après administration par voie orale chez le rat juvénile (1 000 mg/kg/jour).

Pour le propyl parabène, un effet sur la spermatogenèse sans altération du poids des organes reproducteurs mâles a été rapporté : diminution de la quantité testiculaire et épидидymaire de spermatozoïdes (environ 50 % des témoins à la dose de 1 000 mg/kg/jour) ; diminution de la production journalière de spermatozoïdes dans tous les groupes (environ 70 % des témoins) ; diminution dose dépendante de la concentration sérique en testostérone. Cette étude a été critiquée dans de nombreuses évaluations des agences sanitaires, en raison du faible nombre d'animaux utilisés, du manque de détails fournis, de variations importantes dans les poids des animaux, et dans les dosages hormonaux... Il faut également noter que la durée de l'étude ne couvre pas un cycle complet de spermatogenèse (52 jours chez le rat).

Concernant le butyl parabène, une étude récente chez le rat menée dans des conditions expérimentales satisfaisantes, a montré l'absence d'effet sur les organes reproducteurs mâles.

Chez la souris, aucun effet du butyl parabène n'a été décrit sur le poids de la prostate, des vésicules séminales, et des glandes préputiales. Cependant, le poids de l'épididyme apparaît légèrement augmenté à la dose la plus forte (1 000 mg/kg/jour). Une diminution dose dépendante des spermatides dans les tubes séminifères, sans modification du nombre des spermatogonies et spermatocytes, est observée. La testostérone sérique est significativement diminuée à la dose de 1 000 mg/kg/jour.

Quelques études ont analysé l'effet des parabènes sur les paramètres reproducteurs de la femelle. Une étude récente indique qu'une forte dose de méthyl et d'isopropyl parabène (1000 mg/kg/jour) entraîne un retard significatif dans la survenue de l'ouverture vaginale (signe de la puberté chez les rongeurs femelles) ainsi qu'une diminution de la longueur de l'œstrus. Cette forte dose des deux composés est responsable d'une diminution du poids des ovaires, d'un manque de corps jaune, et d'une augmentation du nombre de follicules kystiques. L'analyse histologique révèle des anomalies au niveau de l'utérus, à savoir une hypertrophie du myomètre, pour la dose la plus élevée de propyl et d'isopropyl parabène (1000 mg/kg/jour) et pour toutes les doses de butyl and isobutyl parabène (62, 5, 250, 1000 mg/kg/jour). Les niveaux d'œstradiol sont significativement réduits chez les animaux traités par méthyl, éthyl, propyl, isopropyl et isobutyl parabènes. Les autres études montrent principalement une augmentation du poids de l'utérus.

VI-Toxicologie de la grossesse.

Dans le monde entier, le nombre de femmes ayant un emploi rémunéré est en augmentation. Aux Etats-Unis, par exemple, près de 70% des femmes travaillent hors de chez elles au cours de leurs principales années d'activité génitale (entre 20 et 34 ans). Par ailleurs, depuis les années quarante, on enregistre une augmentation à peu près linéaire de la fabrication de produits chimiques organiques de synthèse, ce qui crée un environnement plus dangereux pour la femme enceinte qui travaille et pour sa descendance.

La réussite de la reproduction d'un couple dépend finalement d'un équilibre biochimique délicat chez le père, la mère et le fœtus, et entre eux. Les modifications métaboliques qui se produisent au cours de la grossesse peuvent augmenter l'exposition à des toxiques dangereux à la fois pour la femme et pour le produit de conception. Parmi ces modifications métaboliques, on compte l'augmentation de l'absorption pulmonaire et du débit cardiaque, le retard de vidange gastrique, l'augmentation de la motilité intestinale et de la quantité de graisses corporelles. Comme le montre la figure 13, l'exposition du produit de conception peut avoir différents effets selon le stade de développement — précoce ou tardif — de l'embryogenèse, ou période fœtale.

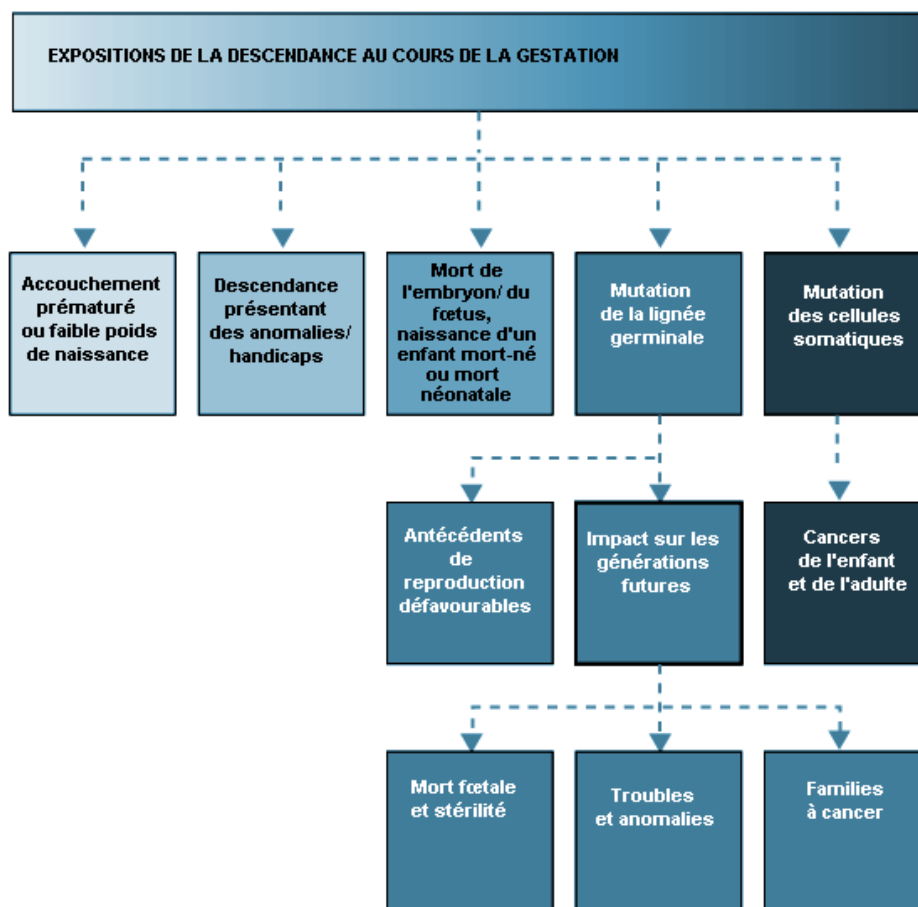


Figure 13 Conséquences pour la descendance de l'exposition maternelle à des toxiques

La durée du transport d'un ovule fécondé avant l'implantation est de deux à six jours. Au cours de ce stade précoce, l'embryon peut se trouver exposé à des substances chimiques qui pénètrent dans les liquides utérins. L'absorption de xénobiotiques peut s'accompagner de modifications dégénératives, d'une altération du profil protidique du blastocyste ou d'un échec de l'implantation. Durant cette période, une agression est susceptible de provoquer un avortement spontané. D'après des données expérimentales, on pense que l'embryon est assez résistant aux agressions tératogènes au cours de ce stade précoce, car les cellules n'ont pas encore amorcé la séquence complexe de la différenciation chimique.

La période plus tardive d'embryogenèse est caractérisée par la différenciation, la mobilisation et l'organisation des cellules et des tissus en ébauches d'organes. Une pathogenèse précoce peut provoquer la mort cellulaire, un échec de l'interaction cellulaire, une réduction de la biosynthèse, des anomalies des déplacements morphogénétiques, une perturbation mécanique, des adhérences ou un œdème (Paul, 1993). Les facteurs de médiation qui déterminent la susceptibilité aux effets sont la voie, le niveau et le schéma d'exposition, ainsi que le génotype fœtal et maternel. Des facteurs extrinsèques, comme les carences alimentaires ou les effets additionnels, synergiques ou antagonistes, associés à des expositions répétées, peuvent avoir un impact supplémentaire sur la réponse. Les principales réactions indésirables au cours de la phase tardive de l'embryogenèse sont l'avortement spontané, les anomalies structurales macroscopiques, la mort fœtale, un retard de croissance ou des anomalies du développement psychomoteur.

La période fœtale, qui va de l'embryogenèse à la naissance, commence entre le 54^e et le 60^e jour de la gestation, le produit de conception mesurant 33 mm du vertex au coccyx. La distinction entre la période embryonnaire et la période fœtale est quelque peu arbitraire. Du point de vue du développement, la période fœtale se caractérise par la croissance, l'histogenèse et la maturation fonctionnelle. Un effet toxique peut se manifester par une diminution de la taille et du nombre de cellules. Le cerveau demeure sensible aux agressions; la myélinisation est incomplète jusqu'à la période postnatale. Un effet toxique au cours de la période fœtale peut provoquer un retard de croissance, des troubles fonctionnels, des perturbations de la grossesse, des troubles comportementaux, une cancérogenèse transplacentaire ou la mort. Le présent article traite des effets biologiques, sociologiques et épidémiologiques de l'exposition maternelle professionnelle ou environnementale.

A-La mort embryonnaire/fœtale

Les stades de développement du zygote, qui se comptent en jours à partir de l'ovulation (JOV), vont du stade blastocyste, 15^e au 20^e jour (1 à 6 JOV), l'implantation survenant au 20^e ou au 21^e jour (6 ou 7 JOV), jusqu'à la période embryonnaire, 21^e au 62^e jour (7 à 48 JOV), et la période fœtale du 63^e jour (49 + JOV) jusqu'à la période dite de viabilité, qui va du 140^e au 195^e jour. L'estimation de la probabilité d'un avortement spontané à l'un de ces stades dépend à la fois de la définition de la mort fœtale et de la méthode utilisée pour déterminer cet événement. La définition de stade fœtal précoce et tardif varie considérablement, allant de la fin de la 20^e à la 28^e semaine. Les définitions de mort fœtale et de mort néonatale recommandées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (OMS, 1977) figurent au tableau 3 Aux Etats-Unis, l'âge gestationnel de 20 semaines, qui détermine la limite inférieure pour la naissance d'un enfant mort-né, est maintenant largement accepté.

Tableau 3 Définition de la mort fœtale et de la mort néonatale

Avortement spontané	≤ 500 g ou 20-22 semaines ou 25 cm de longueur
Enfant mort-né	500 g (1 000 g international) non viable
Mort néonatale précoce	Mort d'un nourrisson né vivant ≤ 7 jours (168 heures)
Mort néonatale tardive	7 jours à ≤ 28 jours

Source: Organisation mondiale de la santé, 1977.

Comme la plupart des fœtus issus d'avortements précoces présentent des anomalies chromosomiques, il a été proposé, dans un but de recherche, de faire une distinction plus fine entre la mort fœtale précoce, avant 12 semaines de gestation, et la mort fœtale tardive (Källén, 1988). Lorsqu'on étudie les morts fœtales tardives, il est également judicieux d'inclure les morts néonatales précoces, qui peuvent avoir des causes identiques. L'OMS définit la mort néonatale précoce comme la mort d'un nouveau-né âgé de 7 jours ou moins, la mort néonatale tardive survenant entre le 7^e et le 29^e jour. Dans les études menées dans les pays en développement, il est important de faire la distinction entre la mort *prepartum* et *intrapartum*. En raison des mauvaises conditions d'accouchement, la mort *intrapartum* est à l'origine d'un pourcentage important des naissances de mort-nés dans les pays moins développés.

Dans l'analyse de neuf enquêtes rétrospectives ou transversales effectuée par Kline, Stein et Susser (1989), le pourcentage de morts fœtales avant la 20^e semaine de gestation est compris entre 5,5 et 12,6%. Si la définition est élargie de façon à inclure les morts jusqu'à la 28^e semaine de gestation, il va de 6,2 à 19,6%. Toutefois, dans quatre études prospectives, le pourcentage de morts fœtales pour des grossesses cliniquement diagnostiquées se situait dans des limites relativement étroites, de 11,7 à 14,6% pour une période de gestation allant jusqu'à la 28^e semaine. Ce pourcentage plus faible dans les études prospectives que dans les études rétrospectives et transversales peut être attribué à des différences dans les définitions de base, à des avortements provoqués déclarés comme spontanés et à une classification des retards de règles ou des règles abondantes parmi les morts fœtales.

Lorsqu'on inclut les avortements cachés ou les morts «chimiques» précoces identifiés par une élévation des gonadotrophines chorioniques humaines, le pourcentage total des avortements spontanés augmente de manière spectaculaire. Dans une étude basée sur le dosage de ces gonadotrophines, l'incidence de mort subclinique d'ovules fécondés faisant suite à une implantation était de 22% (Wilcox et coll., 1988). Dans ces études, les gonadotrophines urinaires étaient mesurées par dosage radio-immunométrique utilisant un anticorps de détection. La méthode de dosage, employée à l'origine par Wilcox, faisait appel à un anticorps polyclonal de lapin, à forte affinité, maintenant éteint. Des études plus récentes ont utilisé un anticorps monoclonal inépuisable nécessitant moins de 5 ml d'urine pour la réplification des échantillons. Le facteur limitant l'utilisation de cette méthode de dosage dans les études sur le lieu de travail n'est pas uniquement son coût et les moyens nécessaires pour coordonner le prélèvement, le stockage et l'analyse des échantillons d'urine, mais également l'importance de la population nécessaire. Dans une étude sur les avortements spontanés précoces chez des sujets travaillant sur terminal à écran de visualisation, 7 000 environ avaient été sélectionnés afin d'obtenir une population utilisable de 700 femmes. Cette obligation de recruter une population dix fois plus importante pour obtenir un échantillon de taille adéquate tient à la diminution du nombre de femmes disponibles en raison d'une

inadmissibilité due à l'âge, à la stérilité et au recrutement exclusif de femmes n'utilisant pas de contraceptifs ou pratiquant une forme de contraception relativement inefficace.

Des études plus classiques sur l'exposition professionnelle ont utilisé, afin d'identifier les avortements spontanés, des données enregistrées ou recueillies au moyen de questionnaires. Les sources des données enregistrées étaient des statistiques démographiques et des dossiers médicaux provenant d'hospitalisations et de consultations privées ou hospitalières. L'emploi des systèmes d'enregistrement de données ne permet d'identifier qu'un sous-ensemble de toutes les morts fœtales, essentiellement celles qui surviennent après le début de la surveillance prénatale, en général après deux ou trois mois de retard de règles. Les données provenant de questionnaires sont recueillies soit par courrier, soit au cours d'un entretien téléphonique ou personnel. En interrogeant des femmes sur leurs antécédents gynécologiques, il est possible d'obtenir une documentation plus complète sur toutes les pertes fœtales reconnues. Parmi les questions habituellement incluses dans les antécédents gynécologiques, on trouve toutes les issues des grossesses précédentes, la surveillance prénatale, les antécédents familiaux d'issues défavorables de grossesses, les antécédents matrimoniaux, l'alimentation, le poids avant la grossesse, la taille, la prise de poids, la consommation de cigarettes et d'alcool, la prise de médicaments sur ordonnance ou non, l'état de santé de la mère avant la grossesse et au cours de celle-ci et l'exposition domestique ou professionnelle à des agents physiques et chimiques, tels que vibrations, rayonnements, métaux, solvants et pesticides. Les données fournies par les entretiens peuvent être une source valable d'information sur les avortements spontanés, en particulier si l'analyse inclut ceux survenus à huit semaines ou plus de gestation durant les dix dernières années.

Les principaux facteurs physiques, génétiques, sociaux et environnementaux associés à un avortement spontané sont résumés dans le tableau 4. Afin de s'assurer que la corrélation entre l'exposition et l'effet observé n'est pas due à d'autres facteurs de risque (facteurs de confusion), il est important d'identifier ceux qui peuvent être associés à l'issue considérée. Les maladies associées à une mort fœtale sont la syphilis, la rubéole, les infections génitales à mycoplasmes, l'herpès, les infections utérines et l'hyperthermie généralisée. Parmi les facteurs de risque les plus importants d'avortement spontané cliniquement diagnostiqué figurent les antécédents de fausse couche. La grande multiparité est associée à une augmentation du risque, mais elle peut être associée à des antécédents d'avortement spontané. La multiparité en tant que facteur de risque peut être interprétée de diverses manières en raison de son association avec l'âge maternel, les antécédents gynécologiques et l'hétérogénéité des femmes à différents degrés de parité. Le pourcentage des avortements spontanés est plus élevé chez les femmes de moins de 16 ans et de plus de 36 ans. Après ajustement du nombre de grossesses et des antécédents d'avortement, le risque de perte fœtale est deux fois plus élevé chez les femmes de plus de 40 ans que chez les femmes plus jeunes. L'augmentation du risque avec l'âge a été associée à une augmentation des anomalies chromosomiques, de la trisomie en particulier. La possibilité de perte fœtale à médiation masculine a été rapportée récemment (Savitz, Sonnenfeld et Olshan, 1994). On a montré l'existence d'une relation plus nette avec une exposition paternelle au mercure et aux gaz anesthésiques, ainsi qu'une relation évocatrice, mais irrégulière, avec l'exposition au plomb, ainsi qu'avec la fabrication du caoutchouc et de certains solvants et pesticides.

Tableau 4 Facteurs associés à un retard de croissance intra-utérine et à une mort fœtale

Retard de croissance intra-utérine	
Physiques et génétiques	Environnementaux et sociaux
Prématurité	Malnutrition
Naissances multiples	Faibles revenus/faible niveau d'instruction
Malformation du fœtus	Tabagisme maternel
Hypertension	Alcoolisme maternel
Anomalie du placenta ou du cordon	Exposition professionnelle
Antécédents médicaux maternels	Stress psychosocial
Antécédents d'issue pathologique de grossesse	Altitude
Race	Antécédents d'infections
Anomalies chromosomiques	Consommation de marijuana
Sexe	
Taille, poids et gain pondéral de la mère	
Taille du père	
Parité	
Durée de la gestation	
Grossesses rapprochées	
Mort fœtale	
Physiques et génétiques	Environnementaux et sociaux
Multiparité	Conditions socio-économiques
Age de la mère	Antécédents de tabagisme
Ordre de naissance	Consommation de médicaments et de drogues douces
Race	Alcoolisme
Avortements spontanés à répétition	Mauvaise alimentation
Diabète insulino-dépendant	Infections/fièvre maternelles
Troubles utérins	Spermicides
Gémellité	Facteurs professionnels
Facteur immunologique	Exposition à des produits chimiques
Facteurs hormonaux	Irradiation

La situation dans la profession peut constituer un facteur de risque, quel que soit le risque physique ou chimique, et se comporter comme un facteur de confusion dans l'évaluation de l'exposition professionnelle et de l'avortement spontané. Certains chercheurs estiment que les femmes qui continuent à travailler sont plus susceptibles d'avoir une issue de grossesse défavorable et peuvent, de ce fait, continuer à travailler; d'autres pensent que ce groupe représente un sous-ensemble de population mieux protégé par nature en raison de revenus plus élevés et d'un meilleur suivi prénatal.

B-Les anomalies congénitales

Pendant les 60 premiers jours suivant la conception, le fœtus est sans doute plus sensible aux toxiques xénobiotiques qu'à tout autre stade de la vie. Historiquement, les monstruosité et les malformations congénitales étaient des défauts structuraux présents à la naissance, visibles à l'œil nu ou au microscope, internes ou externes, héréditaires ou non, uniques ou multiples. Actuellement, la définition de l'anomalie congénitale est plus large et comprend les anomalies comportementales, fonctionnelles et biochimiques. Les malformations peuvent être uniques ou multiples; les altérations chromosomiques produisent généralement des troubles multiples, tandis que les modifications d'un gène unique ou l'exposition à des agents présents dans l'environnement peuvent provoquer un défaut unique ou un syndrome.

L'incidence des malformations dépend de l'état du produit de conception: enfant vivant, produit d'un avortement spontané, mort-né. Le pourcentage global d'anomalies dans les produits d'avortements spontanés est de 19% environ, soit dix fois plus que chez les nouveau-nés vivants (Shepard, Fantel et Fitsimmons, 1989). Un taux d'anomalies de 32% a été observé chez des fœtus mort-nés pesant plus de 500 g. L'incidence des malformations majeures chez les nouveau-nés viables est d'environ 2,24% (Nelson et Holmes, 1989). La prévalence des malformations mineures va de 3 à 15% (environ 10% en moyenne). Les anomalies congénitales sont associées à des facteurs génétiques (10,1%), à un héritage multifactoriel (23%), à des facteurs utérins (2,5%), à la gémellité (0,4%) ou à des substances tératogènes (3,2%). Les autres malformations sont de cause inconnue. Le pourcentage de malformations est plus élevé de 41% chez les garçons que chez les filles, ce qui s'explique par le pourcentage significativement plus élevé d'anomalies des organes génitaux chez les garçons.

L'une des difficultés, lorsqu'on étudie les malformations, tient à leur classification. Les anomalies peuvent être classées suivant plusieurs paramètres: gravité (majeure, mineure), mécanisme physiopathologique (déformation, perturbation), survenue (associée, isolée), appareil touché et étiologie (atteintes chromosomiques, anomalie génique ponctuelle ou action d'une substance tératogène, par exemple). Il arrive souvent que toutes les malformations soient associées ou qu'elles soient toutes majeures ou mineures. On peut définir une malformation majeure comme celle qui provoque la mort, qui nécessite une intervention chirurgicale ou un traitement médical, ou qui constitue un handicap physique ou psychologique important. La raison pour laquelle les anomalies sont classées en grands groupes est que la majorité d'entre elles surviennent à peu près pendant la même période, au cours de l'organogenèse. Ainsi, plus les échantillons sont grands, plus la puissance statistique augmente avec le nombre total de cas. Toutefois, si l'effet d'une exposition est spécifique d'un certain type de malformation (atteinte du système nerveux central, par exemple), il peut être masqué par ce type de regroupement. On peut également regrouper les malformations par appareil. Si cette méthode représente un progrès, certains défauts peuvent dominer la classe, comme le pied varus dans le système musculo-squelettique. Pour un échantillon d'une taille suffisante, l'approche optimale consiste à répartir les malformations en groupes homogènes du point de vue embryologique et pathogénique (Källén, 1988). Il faut être attentif à l'exclusion ou à l'inclusion de certaines malformations, comme celles qui sont vraisemblablement dues à des aberrations chromosomiques, à des caractères autosomiques dominants ou à une malposition in utero. Enfin, quand on analyse les anomalies congénitales, il faut maintenir un équilibre entre la précision et la puissance statistique.

Un certain nombre de toxiques liés à l'environnement ou à la profession ont été associés à des malformations congénitales dans la descendance. L'un des plus importants est la

consommation maternelle d'aliments contaminés par du méthylmercure, qui provoque des anomalies morphologiques et du système nerveux central, ainsi que des troubles neurocomportementaux. Au Japon, la grande majorité des cas était due à la consommation de poisson et de fruits de mer contaminés par le mercure provenant des effluents d'une usine chimique. Les enfants les plus sévèrement touchés présentaient une infirmité motrice cérébrale. Les mères ayant ingéré des biphényles polychlorés provenant d'huile de riz contaminée ont donné naissance à des bébés atteints de troubles multiples, parmi lesquels un retard de croissance, une pigmentation brune de la peau, la percée précoce des dents, une hyperplasie gingivale, un élargissement de la suture sagittale, un œdème facial et une exophtalmie. Des professions comportant une exposition à des mélanges ont été associées à différents types d'issues de grossesses défavorables. Chez les enfants de femmes travaillant dans l'industrie de la pâte à papier, soit dans un laboratoire, soit à des tâches comprenant des «transformations» ou un affinage du papier, le risque d'anomalie du système nerveux central, d'atteinte cardiaque ou de fentes faciales était plus élevé. Chez les enfants de femmes travaillant dans l'industrie ou dans le bâtiment et soumises à des expositions non spécifiées, on a pu constater une augmentation de 50% des anomalies du système nerveux central et, chez les femmes travaillant dans les transports et les communications, on a noté un risque deux fois plus important de donner naissance à un enfant porteur d'une fente faciale. Les vétérinaires constituent un groupe particulier de personnel médical exposé aux gaz anesthésiques, aux rayonnements, aux traumatismes dus aux coups de pied des animaux, aux insecticides et aux zoonoses. Si aucune différence n'a été observée dans le pourcentage d'avortements spontanés et dans le poids de naissance des enfants entre les femmes vétérinaires et les avocates, le nombre d'anomalies congénitales est, en revanche, beaucoup plus important chez les vétérinaires (Schenker et coll., 1990). Il existe des listes regroupant les produits tératogènes connus, les produits éventuellement tératogènes et les produits probablement non tératogènes, ainsi que des bases de données informatiques et des lignes d'appel d'urgence donnant des informations à jour sur les tératogènes potentiels (Paul, 1993). Toutefois, il est particulièrement difficile d'évaluer les anomalies congénitales dans une cohorte de femmes actives en raison de la taille de l'échantillon requis pour avoir une représentation statistique significative, ainsi que des limites de notre capacité d'identifier des expositions spécifiques survenant pendant un court laps de temps, essentiellement pendant les 55 premiers jours de la gestation.

C-Le retard de la croissance intra-utérine et l'hypotrophie

Parmi les multiples facteurs liés à la survie du nouveau-né, le sous-développement physique associé à un faible poids de naissance représente l'un des risques majeurs. Il faut attendre le deuxième trimestre de la gestation pour que le fœtus commence réellement à prendre du poids. Le produit de conception pèse 1 g à 8 semaines, 14 g à 12 semaines et il atteint 1 100 g à 28 semaines. Ensuite, il prend 1 100 g toutes les 6 semaines, jusqu'au terme. Le nouveau-né normal pèse environ 3 200 g à terme. Son poids dépend de son rythme de croissance et de son âge gestationnel au moment de l'accouchement. On dit d'un nouveau-né dont la croissance a été retardée qu'il est hypotrophe. Un nouveau-né né avant terme aura un poids réduit, mais pas nécessairement un retard de croissance. Les facteurs associés à un accouchement prématuré sont analysés ailleurs, et le sujet de cette étude est le nouveau-né présentant un retard de croissance. Les expressions «faible poids à la naissance» et «hypotrophe» seront utilisées indifféremment. Un faible poids à la naissance est défini comme un poids inférieur à 2 500 g, un très faible poids de naissance correspond à moins de 1 500 g et un poids de naissance extrêmement faible à moins de 1 000 g (OMS, 1969).

Lorsqu'on examine les causes d'un déficit de croissance, il est important de faire la distinction entre les retards de croissance harmonieux et dysharmonieux. Un retard de croissance dysharmonieux, c'est-à-dire lorsque le poids est plus atteint que la structure squelettique, est associé principalement à un facteur de risque intervenant à la fin de la grossesse. En revanche, un retard de croissance harmonieux sera plus vraisemblablement associé à une cause agissant pendant toute la durée de la gestation (Kline, Stein et Susser, 1989). La différence entre les pourcentages de retard de croissance dysharmonieux et harmonieux est particulièrement nette lorsqu'on compare les pays développés et les pays en développement. Dans ces derniers, le pourcentage de retard de croissance est de 10 à 43%; il s'agit essentiellement d'un retard harmonieux, le principal facteur de risque étant la sous-alimentation. Dans les pays développés, ce pourcentage est habituellement beaucoup plus faible, de 3 à 8%; il est généralement dysharmonieux et d'étiologie multifactorielle. C'est pourquoi la proportion de nouveau-nés ayant un faible poids de naissance, définie comme retard de croissance intra-utérin plutôt que comme prématurité, varie spectaculairement d'un pays à l'autre. En Suède et aux Etats-Unis, le pourcentage est d'environ 45%, alors que dans les pays en développement, comme l'Inde, il varie entre 79 et 96% environ (Villar et Belizan, 1982).

Des études sur la famine menées aux Pays-Bas ont montré qu'une carence alimentaire limitée au troisième trimestre de la grossesse diminue la croissance fœtale d'une manière dysharmonieuse, avec une anomalie portant essentiellement sur le poids de naissance, le périmètre crânien étant moins atteint (Stein, Susser et Saenger, 1975). Une croissance dysharmonieuse a également été observée dans des études d'exposition à des agents environnementaux. Dans une étude portant sur 202 femmes enceintes habitant près d'une zone dans laquelle le risque d'exposition au plomb était élevé, des prélèvements sanguins ont été pratiqués sur les mères pendant la période prénatale, entre la 6^e et la 28^e semaine de gestation (Bornschein, Grote et Mitchell, 1989). Après ajustement en fonction d'autres facteurs de risque pertinents, dont la durée de la gestation, les conditions socio-économiques, la consommation d'alcool et de tabac, la présence de plomb dans le sang a été associée à une diminution du poids et de la taille de naissance, mais pas au périmètre crânien. La présence de plomb dans le sang de la mère n'a été un facteur de risque pour la taille que chez les enfants caucasiens. La taille de naissance des nouveau-nés caucasiens était réduite de 2,5 cm environ par palier d'unité de log de la plombémie maternelle. Il faut être très prudent dans le choix de la variable étudiée. Si, dans cette étude, on avait choisi uniquement le poids de naissance, les effets du plomb sur les autres paramètres de croissance n'auraient peut-être pas été observés. De plus, si les enfants caucasiens et afro-américains avaient été regroupés, les différences observées chez les caucasiens, sans doute dues à des différences génétiques en ce qui concerne le stockage et la capacité de fixation du plomb, auraient pu être ignorées. Après ajustement en fonction d'autres covariables, un facteur de confusion significatif a également été observé entre la plombémie prénatale, l'âge de la mère et le poids de naissance du bébé. Ces résultats montrent que, pour une femme de 30 ans ayant une plombémie estimée à 20 µg/dl environ, l'enfant pesait 2 500 g environ, alors que celui d'une femme de 20 ans ayant une plombémie similaire pesait environ 3 000 g. Les chercheurs pensent que cette différence pourrait indiquer soit que les femmes plus âgées sont plus sensibles à l'agression supplémentaire représentée par l'exposition au plomb, soit qu'elles pourraient avoir été exposées à une quantité plus importante de plomb en raison d'un plus grand nombre d'années d'exposition ou de concentrations ambiantes de plomb supérieures lorsqu'elles étaient enfants. L'augmentation de la tension artérielle pourrait être un autre facteur. Toutefois, la leçon importante à tirer de cette étude est qu'il est nécessaire d'examiner attentivement les sous-populations à haut risque en fonction de l'âge, de la race, de la situation économique, des

habitudes de vie, du sexe de l'enfant et d'autres différences génétiques, afin de découvrir les effets les plus subtils d'une exposition sur la croissance et le développement fœtaux.

Le tableau 4 résume les facteurs de risque associés à un faible poids de naissance. La classe sociale, évaluée en termes de revenus ou d'instruction, demeure un facteur de risque dans les cas où il n'y a pas de différences ethniques. Le tabagisme, le travail physique, la surveillance prénatale et l'alimentation sont aussi des facteurs qui peuvent dépendre de la classe sociale ou de la race. Les femmes entre 25 et 29 ans ont moins de risques de mettre au monde un enfant présentant un retard de croissance. Le tabagisme maternel augmente le risque de faible poids de naissance du nouveau-né, de 200% environ chez les grandes fumeuses. Parmi les maladies maternelles entraînant un faible poids, on peut citer les anomalies du placenta, les cardiopathies, les pneumonies virales, les atteintes hépatiques, la prééclampsie, l'éclampsie, l'hypertension chronique, la prise de poids et des vomissements importants. Des antécédents de grossesse pathologique, de mort fœtale, d'accouchement prématuré ou de naissance d'un enfant de faible poids multiplient par deux ou quatre le risque de faible poids à la naissance. Un intervalle de moins d'un an entre les naissances triple le risque d'avoir un nouveau-né de faible poids. Les anomalies chromosomiques associées à une croissance anormale sont le syndrome de Down, la trisomie 18 et la plupart des syndromes malformatifs.

Le tabagisme est l'un des principaux comportements les plus directement liés à la naissance d'enfants ayant un faible poids de naissance. Il a été démontré que le tabagisme maternel durant la grossesse multiplie par deux ou trois le risque d'avoir un enfant de faible poids à la naissance et qu'il entraîne un déficit pondéral de 150 à 400 g. La nicotine et l'oxyde de carbone sont considérés comme étant les agents les plus vraisemblablement responsables, car tous deux traversent rapidement et préférentiellement la barrière placentaire. La nicotine est un vasoconstricteur puissant et des différences significatives dans la taille des vaisseaux ombilicaux des mères fumeuses ont été observées. La quantité d'oxyde de carbone dans la fumée de cigarette varie de 20 000 à 60 000 ppm. L'oxyde de carbone a une affinité pour l'hémoglobine 210 fois supérieure à celle de l'oxygène et, en raison d'une faible pression artérielle en oxygène, le fœtus est particulièrement touché. Pour d'autres chercheurs, ces effets ne sont pas dus à la fumée, mais aux caractéristiques des fumeurs. Certaines professions comportant une exposition potentielle à l'oxyde de carbone, comme celles associées à la pâte à papier, aux hauts fourneaux, à l'acétylène, aux brasseries, au noir de carbone, aux fours à coke, aux garages, à la synthèse de produits organiques et aux raffineries de pétrole, doivent être considérées comme des métiers à haut risque pour les employées enceintes.

L'alcool, qui est également très utilisé et qui fait l'objet de nombreuses études, est associé à un retard de croissance fœtale (ainsi qu'à des anomalies congénitales). Une étude menée sur 9 236 naissances a montré qu'une consommation maternelle d'alcool supérieure à 45,36 g par jour entraînait une augmentation du taux d'enfants mort-nés ou porteurs d'un retard de croissance (Kaminski, Rumeau et Schwartz, 1978). L'ingestion d'alcool par la mère s'accompagne également d'une diminution de la taille et du périmètre crânien.

Lorsqu'on évalue les effets possibles d'une exposition à des substances toxiques sur le poids de naissance, certains problèmes se posent. Il faut considérer l'accouchement prématuré comme un intermédiaire possible et prendre en compte les effets potentiels sur l'âge gestationnel. De plus, les grossesses plus longues sont davantage exposées aux agents toxiques. Si un nombre suffisant de femmes travaillent jusqu'à ce que leur grossesse soit bien avancée, l'association entre la plus longue exposition cumulée, d'une part, et l'âge gestationnel le plus grand et les bébés les plus gros, d'autre part, ne représente peut-être qu'un

artefact. On dispose d'un certain nombre de techniques permettant de résoudre ce problème, dont une variante du modèle de régression de la table de survie de Cox, qui peut prendre en compte les covariables dépendant de la durée.

La définition du faible poids de naissance pose un autre problème. Les études le définissent souvent comme une variable dichotomique: moins de 2 500 g. Mais il faut que l'exposition soit très puissante pour provoquer une baisse importante du poids des nouveau-nés. Le poids de naissance, défini comme une variable continue et analysé dans un modèle de régression multiple, est plus sensible en ce qui concerne la détection d'effets subtils. S'agissant de l'exposition professionnelle et des enfants hypotrophes, la rareté relative des résultats significatifs dans la littérature peut être due, dans une certaine mesure, à l'ignorance de ces modèles et de ces résultats d'analyse.

Les études sur les issues de grossesse défavorables doivent caractériser les expositions pendant un laps de temps plutôt court. Si la femme a changé de travail ou si elle a cessé de travailler pendant une période critique, comme l'organogenèse, il se peut que la relation exposition-effet soit profondément modifiée. Par conséquent, le chercheur est tenu à des critères stricts pour identifier l'exposition de la femme pendant une période critique, à l'inverse des études sur les maladies chroniques pour lesquelles des erreurs de quelques mois, voire de quelques années, n'ont souvent qu'un impact minime.

Le retard de croissances intra-utérines, les anomalies congénitales et les avortements spontanés sont souvent évalués dans les études sur l'exposition professionnelle. Plusieurs approches permettent d'étudier chacune de ces issues. Ces problèmes sont importants pour la santé publique en raison de leur coût à la fois psychologique et financier. On a généralement observé une absence de spécificité dans le rapport exposition-issue, par exemple pour l'exposition au plomb, aux gaz anesthésiques et aux solvants. Du fait que la relation exposition-effet peut ne pas être spécifique, il est nécessaire de concevoir des études permettant d'analyser plusieurs issues associées à une série de mécanismes possibles.

V- Radiosensibilité des cellules germinales.

A-L'exposition aux rayonnements

L'exposition à des rayonnements ionisants est un danger reconnu pour la santé, qui est généralement le résultat d'une exposition importante, accidentelle ou à but médical. Du fait qu'elle peut endommager les cellules qui prolifèrent rapidement, elle risque d'être très nocive pour le fœtus ou le nouveau-né. L'exposition à des rayonnements émis lors d'une radiographie est généralement d'un très faible niveau et considérée comme inoffensive. Le radon est une source domestique potentielle de rayonnements ionisants; il est présent dans les formations rocheuses de certaines zones géographiques.

Parmi les atteintes prénatales et postnatales des rayonnements, on compte le retard mental ou de croissance, une intelligence moins développée, des malformations congénitales et des cancers. L'exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants est également associée à une augmentation de la prévalence des cancers. Pour ce type d'exposition, l'incidence dépend

de la dose et de l'âge. En fait, c'est chez les femmes qui ont été exposées à des rayonnements ionisants lorsqu'elles étaient jeunes que le risque relatif de cancer du sein est le plus élevé.

On s'est préoccupé récemment des effets possibles des rayonnements non ionisants, ou champs électromagnétiques. L'explication de la relation entre une exposition à des champs électromagnétiques et le cancer n'est pas encore connue et la preuve épidémiologique pas encore claire. Toutefois, plusieurs études internationales ont montré une corrélation entre les champs électromagnétiques et la leucémie et le cancer du sein chez les sujets masculins.

Une trop forte exposition au soleil durant l'enfance a été associée au cancer de la peau et au mélanome (Marks, 1988).

Tout comme de nombreux agents chimiques, les radiations ionisantes peuvent affecter le matériel génétique des cellules germinales et induire des maladies ou anomalies héréditaires dans la descendance de l'individu irradié. De tels désordres, qui apparaissent déjà "spontanément" dans la population, pourront éventuellement causer un préjudice important aux personnes affectées, à leur famille et à la société en général. Déterminer dans quelle mesure l'exposition aux radiations ionisantes est susceptible d'accroître l'incidence des anomalies congénitales et maladies génétiques spontanées, demeure une tâche cruciale pour les politiciens chargés des décisions quant à l'utilisation d'agents potentiellement nocifs. C'est également un problème difficile pour les agences et les responsables chargés d'édicter des règlements et recommandations concernant l'exposition de la femme aux radiations ionisantes, et il est important que ces décisions et conseils puissent s'appuyer sur des bases scientifiques solides.

Les données quantitatives sur les risques de maladies et anomalies génétiquement transmissibles chez l'homme, suite à une exposition aux radiations, sont très peu nombreuses. Aucun accroissement significatif de celles-ci n'a été constaté chez les enfants de personnes irradiées, même parmi la population importante des survivants d'Hiroshima et de Nagasaki. Ceci est notamment dû à la fréquence naturelle élevée de tels dommages et à la difficulté de prouver de manière in équivoque son accroissement dans une population hétérogène. Dès lors, l'estimation des risques doit être essentiellement basée sur les résultats d'études sur animaux, et leur extrapolation doit se fonder sur une compréhension des mécanismes d'action et des différences entre espèces.

On dispose d'un certain nombre d'informations sur les risques génétiques des radiations ionisantes chez l'individu mâle, du fait que les étapes de la maturation des spermatogonies de la souris ressemblent à celles de l'homme, et qu'il existe un certain nombre de données sur les anomalies chromosomiques induites par les radiations dans les cellules germinales de certains primates et même de l'homme.

En ce qui concerne la femelle, les connaissances acquises à ce jour demeurent relativement fragmentaires, notamment en raison des difficultés techniques liées à l'obtention d'ovocytes analysables cyto-génétiquement.

Comme pour le mâle, ces connaissances reposent en grande partie sur les résultats d'expériences réalisées chez la souris. Il existe toutefois d'importantes différences entre espèces, dans la manière dont le matériel génétique est arrangé dans les noyaux des ovocytes immatures (représentant à eux seuls plus de 90 % de la population ovocytaire totale de l'ovaire), ainsi que dans leur sensibilité à la mort radio-induite. A cet égard, le noyau de l'ovocyte immature de souris possède une chromatine d'aspect pulvérulent (type "dictyé"), alors que celui de l'ovocyte immature de la femme a un aspect "diplotène" typique. D'autre part, quelques centaines de mGy suffisent à tuer la plupart des ovocytes immatures chez la

souris et à rendre celle-ci très rapidement stérile, alors que plusieurs Gy sont requis pour provoquer la stérilité chez une femme.

Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que l'ovocyte de cobaye, contrairement à ceux de la souris et des autres rongeurs, possédait des caractéristiques morphologiques et de sensibilité aux radiations ionisantes fort proches de celles de la femme (Jacquet et al., 1994). Ces caractéristiques suggèrent que le cobaye représente un des meilleurs modèles pour l'évaluation des risques génétiques des radiations chez l'homme.

B-Types d'effets considérés

Les anomalies chromosomiques structurelles constituent une partie importante des dommages génétiques produits par les radiations. Du point de vue des risques génétiques, seules les anomalies chromosomiques induites dans les cellules germinales ou dans leurs prédécesseurs immatures sont à considérer; les aberrations induites dans les cellules somatiques peuvent éventuellement causer des préjudices à l'individu concerné, mais elles ne seront pas transmises à sa descendance.

Parmi les anomalies chromosomiques structurelles, les "translocations" réciproques entre chromosomes non homologues occupent une place essentielle. Celles-ci sont des aberrations stables qui peuvent être transmises à la descendance avec une grande efficacité, entraînant éventuellement chez celle-ci des anomalies congénitales ou retards mentaux sévères. Les translocations et autres aberrations chromosomiques de structure peuvent être visualisées sous le microscope, dans les ovocytes fixés en métaphase de première division méiotique.

C-Procédure d'analyse

Chez la souris femelle, l'utilisation conjointe d'hormones "superovulantes" et de colchicine permet d'obtenir aisément de grandes quantités d'ovocytes en métaphase de première division méiotique (MI). Cette technique est toutefois inopérante chez le cobaye. De plus, chez cette dernière espèce, le nombre d'ovocytes ovulés au cours de chaque cycle est peu élevé (habituellement 2 à 5). La meilleure façon d'obtenir un nombre suffisant d'ovocytes en MI consiste donc à prélever dans les ovaires les ovocytes "méiotiquement compétents" (c'est à dire ceux ayant atteint une taille critique nécessaire pour leur évolution ultérieure en culture), et à les cultiver *in vitro* jusqu'à ce stade. La culture d'ovocytes de cobaye et la préparation de leurs chromosomes présentent un certain nombre de difficultés, entre autres le fait que le nombre de chromosomes est très élevé (64), ce qui rend l'obtention de métaphases complètes encore plus difficile que chez la souris (40 chromosomes).

Nous avons donc consacré un certain temps à développer des méthodes permettant la maturation* *in vitro* des ovocytes de cette espèce, et leur préparation en vue de leur examen cytogénétique en MI. Ces méthodes ont été décrites en détails dans un article (P. Jacquet et al., 1995).

En MI, les 64 chromosomes du cobaye apparaissent normalement groupés sous forme de 32 paires d'homologues, ou "bivalents". Des cassures suivies de recombinaisons entre 2 ou plusieurs chromosomes de paires différentes (translocations) donneront lieu à des associations aberrantes, visibles sous le microscope : formation de figures trivalentes, quadrivalentes....en chaînes ou en anneaux.

(* Le mot "maturation" est ici pris dans le sens restrictif de la reprise de la méiose par le noyau quiescent de l'ovocyte, bloqué jusqu'alors au stade diplotène de fin de prophase; la "maturation" ne dure que quelques heures et se réalise juste avant l'ovulation. Des confusions sont fréquentes, du fait de l'utilisation de l'expression "ovocyte immature", où le mot

immature désigne un ovocyte n'ayant pas encore entamé sa croissance qui, elle, durera un certain nombre de semaines).

D-Irradiation

Les premières expériences ont porté sur la radiosensibilité de l'ovocyte immature. A cette fin, des cobayes adultes (3-4 mois) ont été accouplés, et les femelles nouveau-nées ont été irradiées sur les ovaires avec 1 ou 2 Gy de rayons X. Les irradiations ont eu lieu au cours des 2 premiers jours suivant la naissance, soit à un moment où un maximum d'ovocytes sont du type immature "diplotène", et la collecte des ovocytes a eu lieu lorsque les animaux avaient atteint l'âge d'un an, afin d'être sûr que les ovocytes examinés étaient bien au stade immature au moment de l'irradiation. Les ovocytes "méiotiquement compétents" ont été prélevés par ponction des follicules situés en surface des ovaires, le 10^e jour d'un cycle. Ils ont été cultivés pendant 6 heures, durée nécessaire à la reprise de la méiose et l'arrivée en MI.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la radiosensibilité de l'ovocyte aux stades ultérieurs de sa croissance, soit 15, 8, 4, 3, 2 ou 1 semaine avant l'ovulation, ou encore 2 jours avant celle-ci. Pour ces expériences, les ovaires d'animaux adultes ont été irradiés avec 1, 2 ou 4 Gy, et leurs ovocytes méiotiquement compétents ont été récoltés et cultivés le 10^e jour d'un cycle (premières expériences), ou le 15^e (expériences suivantes).

Enfin, pour l'étude de la transmission des translocations chromosomiques à la descendance, les ovaires de femelles adultes ont été irradiés avec 1 Gy 2 jours avant l'ovulation (15^e jour), c'est-à-dire à un stade particulièrement propice à l'induction de telles aberrations. Les femelles ont été mises en présence de mâles, et les ovocytes de leur descendance femelle ont été analysés lorsque les jeunes animaux avaient atteint l'âge de 4 mois. La qualité insuffisante des préparations de testicules (quelle que soit la technique utilisée) n'a pas permis une analyse cytogénétique objective des spermatocytes chez la descendance mâle. D'autre part, il a été procédé à l'examen externe de tous les jeunes animaux (mâles et femelles), afin de déceler la présence éventuelle d'anomalies congénitales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Apostoli, P., Romeo, L., Peroni, E., Ferioli, A., Ferrari, S., Pasini, F. et Aprili, F., 1989: «Steroid hormone sulphation in lead workers», *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 46, n° 3, pp. 204-208.
- Assennato, G., Paci, C., Baser, M.E., Molinini, R., Candela, R.G., Altmura, B.M. et Giogino, R., 1986: «Sperm count suppression with endocrine dysfunction in lead-exposed men», *Archives of Environmental Health*, vol. 41, n° 6, pp. 387-390.
- Baker, H.W.G., Worgul, T.J., Santen, R.J., Jefferson, L.S. et Bardin, C.W., 1977: «Effect of prolactin on nuclear androgens in perfused male accessory sex organs», dans P. Troen et H. Nankin (directeurs de publication): *The Testis in Normal and Infertile Men* (New York, Raven Press).
- Bardin, C.W., 1986: «Pituitary-testicular axis», dans S.S.C. Yen et R.B. Jaffe (directeurs de publication): *Reproductive Endocrinology* (Philadelphie, W.B. Saunders).
- Bonde, J.P.E., 1992: «Subfertility in relation to welding — A case referent study among male welders», *Danish Medical Bulletin*, vol. 37, pp. 105-108.
- Bornschein, R.L., Grote, J. et Mitchell, T., 1989: «Effects of prenatal lead exposure on infant size at birth», dans M. Smith et L. Grant (directeurs de publication): *Lead Exposure and Child Development* (Boston, Kluwer Academic).
- Chapin, R.E., Dutton, S.L., Ross, M.D., Sumrell, B.M. et Lamb, J.C., IV, 1984: «The effects of ethylene glycol monomethyl ether on testicular histology in F344 rats», *Journal of Andrology*, vol. 5, n° 5, pp. 369-380.
- Chapin, R.E., Dutton, S.L., Ross, M.D. et Lamb, J.C., IV, 1985: «Effects of ethylene glycol monomethyl ether (EGME) on mating performance and epididymal sperm parameters in F344 rats», *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 5, n° 1, pp. 182-189.
- Chia, S.E., Ong, C.N., Lee, S.T. et Tsakok, F.H.M., 1992: «Blood concentrations of lead, cadmium, mercury, zinc, and copper and human semen parameters», *Archives of Andrology*, vol. 29, n° 2, pp. 177-183.
- Culler, M.D. et Negro-Vilar, A., 1986: «Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone», *Endocrinology*, vol. 118, n° 2, pp. 609-612.
- Daniell, W.E. et Vaughan, T.L., 1988: «Paternal employment in solvent related occupations and adverse pregnancy outcomes», *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 45, n° 3, pp. 193-197.
- Ehling, U.H., Macheimer, L., Buselmaier, W., Dycka, J., Froomberg, H., Dratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Peh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M. et Wiemann, H., 1978: «Standard protocol for the dominant lethal test on male mice», *Archives of Toxicology*, vol. 39, n° 3, pp. 173-185.
- Evenson, D.P., 1986: «Flow cytometry of acridine orange stained sperm is a rapid and practical method for monitoring occupational exposure to genotoxicants», dans M. Sorsa et H. Norppa (directeurs de publication): *Monitoring of Occupational Genotoxicants* (New York, Alan R. Liss).

Fabro, S., 1985: «Drugs and male sexual function», *Reproductive Toxicology. A Medical Letter*, vol. 4, pp. 1-4.

Gardner, M. J., Hall, A. J., Snee, M.P., Downes, S., Powell, C.A. et Terrell, J.D., 1990: «Methods and basic design of case-control study of leukemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria», *British Medical Journal*, vol. 300, n° 6722, pp. 429-434.

Hecht, N.B., 1987: «Detecting the effects of toxic agents on spermatogenesis using DNA probes», *Environmental Health Perspectives*, vol. 74, pp. 31-40.

Källén, B., 1988: *Epidemiology of Human Reproduction* (Boca Raton, Floride, CRC Press).

Kaminski, M., Rumeau, C. et Schwartz, D., 1978: «Alcohol consumption in pregnant women and the outcome of pregnancy», *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 2, pp. 155-163.

Kline, J., Stein, Z. et Susser, M., 1989: *Conception to birth-epidemiology of prenatal development*, Monograph in Epidemiology and Biostatistics, vol. 14 (New York, Oxford University Press).

Kotsugi, F., Winters, S. J., Keeping, H.S., Attardi, B., Oshima, H. et Troen, P., 1988: «Effects of inhibin from primate Sertoli cells on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by perfused rat pituitary cells», *Endocrinology*, vol. 122, n° 6, pp. 2796-2802.

Kristensen, P., Irgens, L.M., Daltveit, A.K. et Andersen, A., 1993: «Perinatal outcome among children of men exposed to lead and organic solvents in the printing industry», *American Journal of Epidemiology*, vol. 137, n° 2, pp. 134-144.

Kucera, J., 1968: «Exposure to fat solvents: A possible cause of sacral agenesis in man», *Journal of Pediatrics*, vol. 72, n° 2, pp. 857-859.

Lindbohm, M.L., Hemminki, K. et Kyyronen, P., 1984: «Parental occupational exposure and spontaneous abortions in Finland», *American Journal of Epidemiology*, vol. 120, n° 3, pp. 370-378.

Lindbohm, M.L., Hemminki, K., Bonhomme, M.G., Anttila, A., Rantala, K., Heikkila, P. et Rosenberg, M. J., 1991a: «Effects of paternal occupational exposure on spontaneous abortions», *American Journal of Public Health*, vol. 81, n° 8, pp. 1029-1033.

Lindbohm, M.L., Sallmen, M., Anttila, A., Taskinen, H. et Hemminki, K., 1991b: «Paternal occupational lead exposure and spontaneous abortion», *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, vol. 17, n° 2, pp. 95-103.

Marks, R., 1988: «Role of childhood in the development of skin cancer», *Australian Paediatric Journal*, vol. 24, pp. 337-338.

Matsumoto, A.M., 1989: «Hormonal control of human spermatogenesis», dans H. Burger et D. Kretser (directeurs de publication): *The Testis in Normal and Infertile Men* (New York, Raven Press).

Mattison, D.R., Plowchalk, D.R., Meadows, M. J., Al-Juburi, A.Z., Gandy, J. et Malek, A., 1990: «Reproductive toxicity: Male and female reproductive systems as targets for chemical injury», *Medical Clinics of North America*, vol. 74, n° 2, pp. 391-411.

McDonald, A.D., McDonald, J.C., Armstrong, B., Cherry, N.M., Nolin, A.D. et Robert, D., 1988: «Prematurity and work in pregnancy», *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 45, n° 1, pp. 56-62.

- McLachlan, R.L., Matsumoto, A.M., Burger, H.G., de Kretzer, D.M. et Bremner, W. J., 1988: «Relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the control of inhibin secretion in normal men», *Journal of Clinical Investigation*, vol. 82, n° 3, pp. 880-884.
- Nelson, K. et Holmes, L.B., 1989: «Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants», *New England Journal of Medicine*, vol. 320, n° 1, pp. 19-23.
- Olsen, J., 1983: «Risk of exposure to teratogens amongst laboratory staff and painters», *Danish Medical Bulletin*, vol. 30, pp. 24-28.
- Paul, M., 1993: *Occupational and Environmental Reproductive Hazards: A Guide for Clinicians* (Baltimore, Williams and Wilkins).
- Plant, T.M., 1988: «Puberty in primates», dans E. Knobil et J.D. Neill (directeurs de publication): *The Physiology of Reproduction* (New York, Raven Press).
- Plowchalk, D.R., Meadows, M. J. et Mattison, D.R., 1992: «Female reproductive toxicity», dans *Occupational and Environmental Reproductive Hazards: A Guide for Clinicians, op. cit.*
- Potashnik, G. et Abeliovich, D., 1985: «Chromosomal analysis and health status of children conceived to men during or following dibromochloropropane-induced spermatogenic suppression», *Andrologia*, vol. 17, n° 3, pp. 291-296.
- Ratcliffe, J.M., Schrader, S.M., Steenland, K., Clapp, D.E., Turner, T. et Hornung, R.W., 1987: «Semen quality in papaya workers with long term exposure to ethylene dibromide», *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 44, n° 5, pp. 317-326.
- Referee (The), 1994: *Journal of the Association of Analytic Chemists*, vol. 18, n° 8, pp. 1-16.
- Rodamilans, M., Osaba, M. J.M., To-Figueras, J., Rivera Fillat, F., Marques, J.M., Pérez, P. et Corbella, J., 1988: «Lead toxicity on endocrine testicular function in an occupationally exposed population», *Human Toxicology*, vol. 7, pp. 125-128.
- Sallmen, M., Lindbohm, M.L., Anttila, A., Taskinen, H. et Hemminki, K., 1992: «Paternal occupational lead exposure and congenital malformations», *Journal of Epidemiology and Community Health*, vol. 46, n° 5, pp. 519-522.
- Savitz, D.A., Sonnenfeld, N.L. et Olshan, A.F., 1994: «Review of epidemiologic studies of paternal occupational exposure and spontaneous abortion», *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 25, n° 3, pp. 361-383.
- Savy-Moore, R. J. et Schwartz, N.B., 1980: «Differential control of FSH and LH secretion», *International Review of Physiology*, vol. 22, pp. 203-248.
- Schenker, M.B., Samuels, S. J., Green, R.S. et Wiggins, P., 1990: «Adverse reproductive outcomes among female veterinarians», *American Journal of Epidemiology*, vol. 132, n° 1, pp. 96-106.
- Segal, S., Yaffe, H., Laufer, N. et Ben-David, M., 1979: «Male hyperprolactinemia: Effects on fertility», *Fertility and Sterility*, vol. 32, pp. 556-561.
- Sever, L.E., Gilbert, E.S., Hessol, N.A. et McIntyre, J.M., 1988: «A case-control study of congenital malformations and occupational exposure to low-level radiation», *American Journal of Epidemiology*, vol. 127, n° 2, pp. 226-242.

Sharpe, R.M., 1989: «Follicle-stimulating hormone and spermatogenesis in the adult male», *Journal of Endocrinology*, vol. 121, pp. 405-407.

Shepard, T., Fantel, A.G. et Fitsimmons, J., 1989: «Congenital defect abortuses: Twenty years of monitoring», *Teratology*, vol. 39, pp. 325-331.

Shilon, M., Paz, G.F. et Homonnai, Z.T., 1984: «The use of phenoxybenzamine treatment in premature ejaculation», *Fertility and Sterility*, vol. 42, pp. 659-661.

Stachel, B., Dougherty, R.C., Lahl, U., Schlosser, M. et Zeschmar, B., 1989: «Toxic environmental chemicals in human semen: Analytical method and case studies», *Andrologia*, vol. 21, n° 3, pp. 282-291.

Stein, Z.A., Susser, M.W. et Saenger, G., 1975: *Famine and Human Development. The Dutch Hunger Winter of 1944/45* (New York, Oxford University Press).

Taskinen, H., 1993: «Epidemiological studies in monitoring reproductive effects», *Environmental Health Perspectives*, vol. 101, supplément n° 3, pp. 279-283.

Taskinen, H., Anttila, A., Lindbohm, M.L., Sallmen, M. et Hemminki, K., 1989: «Spontaneous abortions and congenital malformations among the wives of men occupationally exposed to organic solvents», *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, vol. 15, n° 5, pp. 345-352.

Thorner, M.O., Edwards, C.R. W., Hanker, J.P., Abraham, G. et Besser, G.M., 1977: «Prolactin and gonadotropin interaction in the male», dans *The Testis in Normal and Infertile Men*, *op. cit.*

US Environmental Protection Agency (USEPA), 1992: *Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders*, publication n° EPA/600/6-90/006F (Washington, DC, US EPA).

Veulemans, H., Steeno, O., Masschelein, R. et Groesneken, D., 1993. «Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: A case-control study», *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 50, n° 1, pp. 71-78.

Villar, J. et Belizan, J. M., 1982: «The relative contribution of prematurity and fetal growth retardation to low birth weight in developing and developed societies», *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 143, n° 7, pp. 793-798.

Welch, L.S., Schrader, S.M., Turner, T.W. et Cullen, M.R., 1988: «Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction», *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 14, n° 5, pp. 509-526.

Whorton, D., Milby, T.H., Krauss, R.M. et Stubbs, H.A., 1979: «Testicular function in DBCP exposed pesticide workers», *Journal of Occupational Medicine*, vol. 21, n° 3, pp. 161-166.

Wilcox, A. J., Weinberg, C.R., O'Connor, J.F., Baird, D.D., Schlatterer, J.P., Canfield, R.E., Armstrong, E.G. et Nisula, B.C., 1988: «Incidence of early loss of pregnancy», *New England Journal of Medicine*, vol. 319, n° 4, pp. 189-194.

Wilkins, J.R. et Sinks, T., 1990: «Parental occupation and intracranial neoplasms of childhood: Results of a case-control interview study», *American Journal of Epidemiology*, vol. 132, n° 2, pp. 275-292.

Winters, S. J., 1990: «Inhibin is released together with testosterone by the human testis», *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 70, pp. 548-550.

Zaneveld, L. J.D., 1978: «The biology of human spermatozoa», *Obstetrics and Gynecology Annual*, vol. 7, pp. 15-40.

Zikarge, A., 1986: *Cross-Sectional Study of Ethylene Dibromide-Induced Alterations of Seminal Plasma Biochemistry as a Function of Post-Testicular Toxicity with Relationships to Some Indices of Semen Analysis and Endocrine Profile*, dissertation (Houston, Texas, University of Texas Health Science Center).

Zukerman, Z., Rodriguez-Rigau, L. J., Weiss, D.B., Chowdhury, A.K., Smith, K.D. et Steinberger, E., 1978: «Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicular biopsies, and the relation of spermatogenesis to sperm density», *Fertility and Sterility*, vol. 30, pp. 448-455.