

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

---



ANNEE 2003-2004



THESE N°325/11

**LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**  
ETUDE DU NONYLPHENOL ET DE SON TRANSFERT CHEZ  
LA PLANTE

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 17 septembre 2004

PAR

Jean-Philippe BESSE  
Né le 26 août 1977 à TULLE

Directeur de thèse : François Laurent

EXAMINATEURS DE LA THESE

- M. le Professeur Philippe CARDOT .....- Président
- M. François LAURENT.....- Juge
- M. Jean-Philippe BASLY.....- Juge

*Mitakuye oyasin*

(A tous mes parents, prière Lakota)



**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**FACULTE DE PHARMACIE**

---

ANNEE 2003-2004

THESE N°325

**LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

ETUDE DU NONYLPHENOL ET DE SON TRANSFERT CHEZ  
LA PLANTE

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 17 septembre 2004

PAR

Jean-Philippe BESSE  
Né le 26 août 1977 à TULLE

Directeur de thèse : François Laurent

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Philippe CARDOT .....- Président  
M. François LAURENT.....- Juge  
M. Jean-Philippe BASLY.....- Juge





# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

---

### DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

### ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

### PROFESSEURS

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOSGIRAUD</b> Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACIE GALENIQUE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	PARASITOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
<b>GHESTEM</b> Axel	BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE
<b>HABRIOUX</b> Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACODYNAMIE

### SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane



## MAITRES DE CONFERENCES

**ALLAIS** Daovy  
**BASLY** Jean-Philippe  
**BATTU** Serge  
**CALLISTE** Claude  
**CARDI** Patrice  
**CLEDAT** Dominique  
**COMBY** Francis  
**DELEBASSEE** Sylvie  
**DREYFUSS** Marie-Françoise  
**EA KIM** Leng (CLM)  
**FAGNERE** Catherine  
**FROISSARD** Didier  
**FOURNIER** Françoise  
**JAMBUT** Anne Catherine  
**LAGORCE** Jean-François  
**LARTIGUE** Martine  
**LIAGRE** Bertrand  
**LOTFI** Hayat  
**MARION-THORE** Sandrine  
**MOREAU** Jeanne  
**PARTOUCHE** Christian  
**ROUSSEAU** Annick  
**SIMON** Alain  
**TROUILLAS** Patrick  
**VIANA** Marylène  
**VIGNOLES** Philippe

## ASSISTANT

## PROFESSEUR CERTIFIE

**MARBOUTY** Jean-Michel

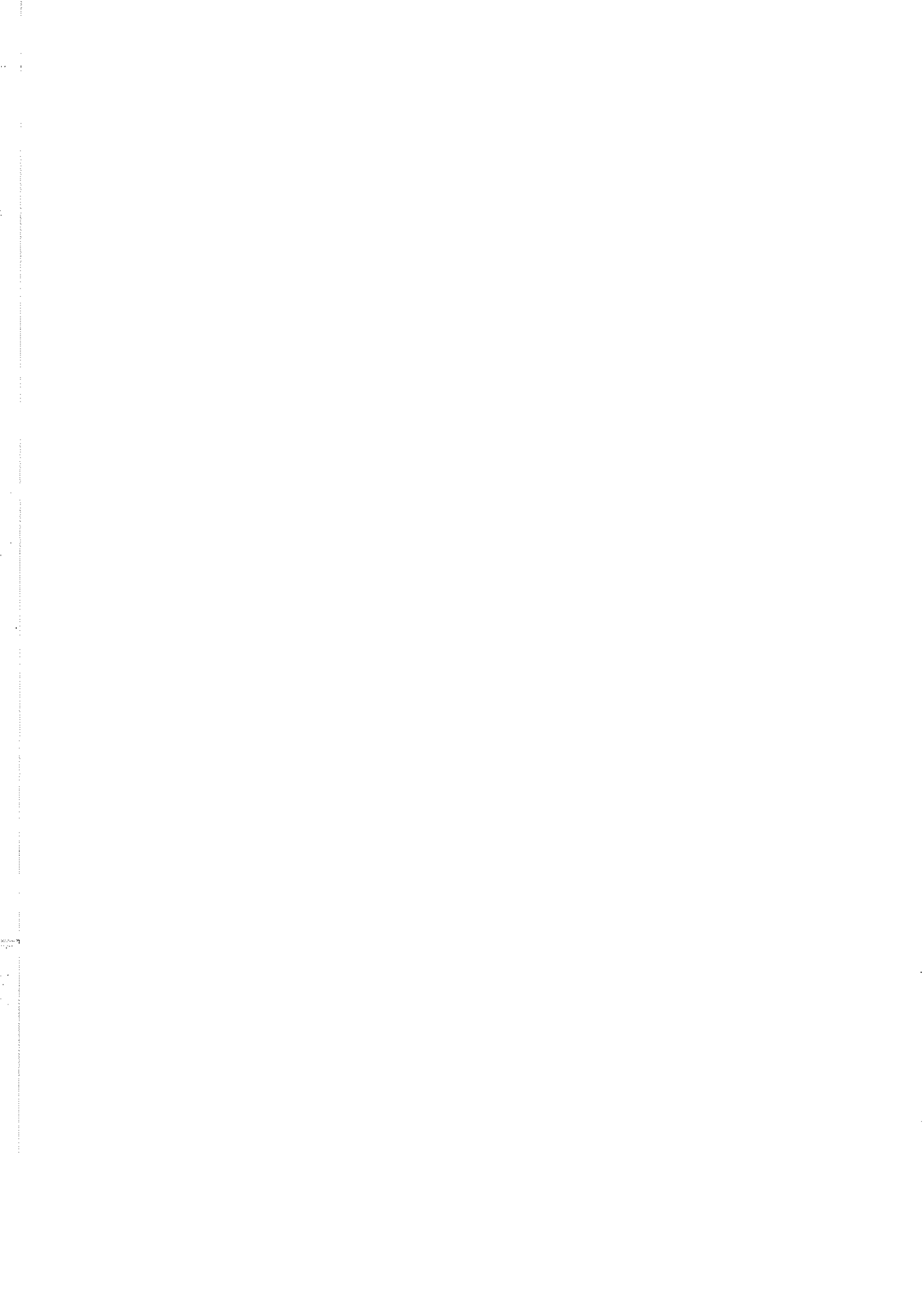
## ATER

**BELLET** Virginie  
**DUCHIRON** Cécile

PHARMACOGNOSIE  
CHIMIE ANALYTIQUE  
CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE  
BIOPHYSIQUE  
PHYSIOLOGIE  
CHIMIE ANALYTIQUE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE  
PHARMACODYNAMIE  
CHIMIE ORGANIQUE  
BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE  
BIOCHIMIE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
CHIMIE ORGANIQUE  
PHARMACODYNAMIE  
SCIENCES BIOLOGIQUES  
TOXICOLOGIE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
IMMUNOLOGIE  
PHYSIOLOGIE  
BIOMATHEMATIQUE  
CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE  
BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE  
PHARMACIE GALENIQUE  
INFORMATIQUE

ANGLAIS





## Remerciements

Je remercie Monsieur François Laurent, pour son encadrement quotidien, sa présence attentive ainsi que ses nombreux conseils, et pour la bonne ambiance dans laquelle j'ai pu effectuer mon stage de DEA.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Philippe Basly pour son aide, sa sympathie et pour avoir accepté de superviser ma thèse (et pour les TPs de bromato).

Je remercie Monsieur Philippe Cardot pour avoir accepté d'être président du jury de thèse ; et parce que finalement, c'est lui qui avait raison ... Et pour toutes les bonnes années de chimie analytique qu'on a passées ensemble...

Un grand merci à Jacques Tulliez pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait bénéficier des largesses de l'INRA.

Je remercie Monsieur Jean-Pierre Cravedi pour ses corrections et pour le temps qu'il m'a accordé malgré son emploi du temps quelque peu chargé.

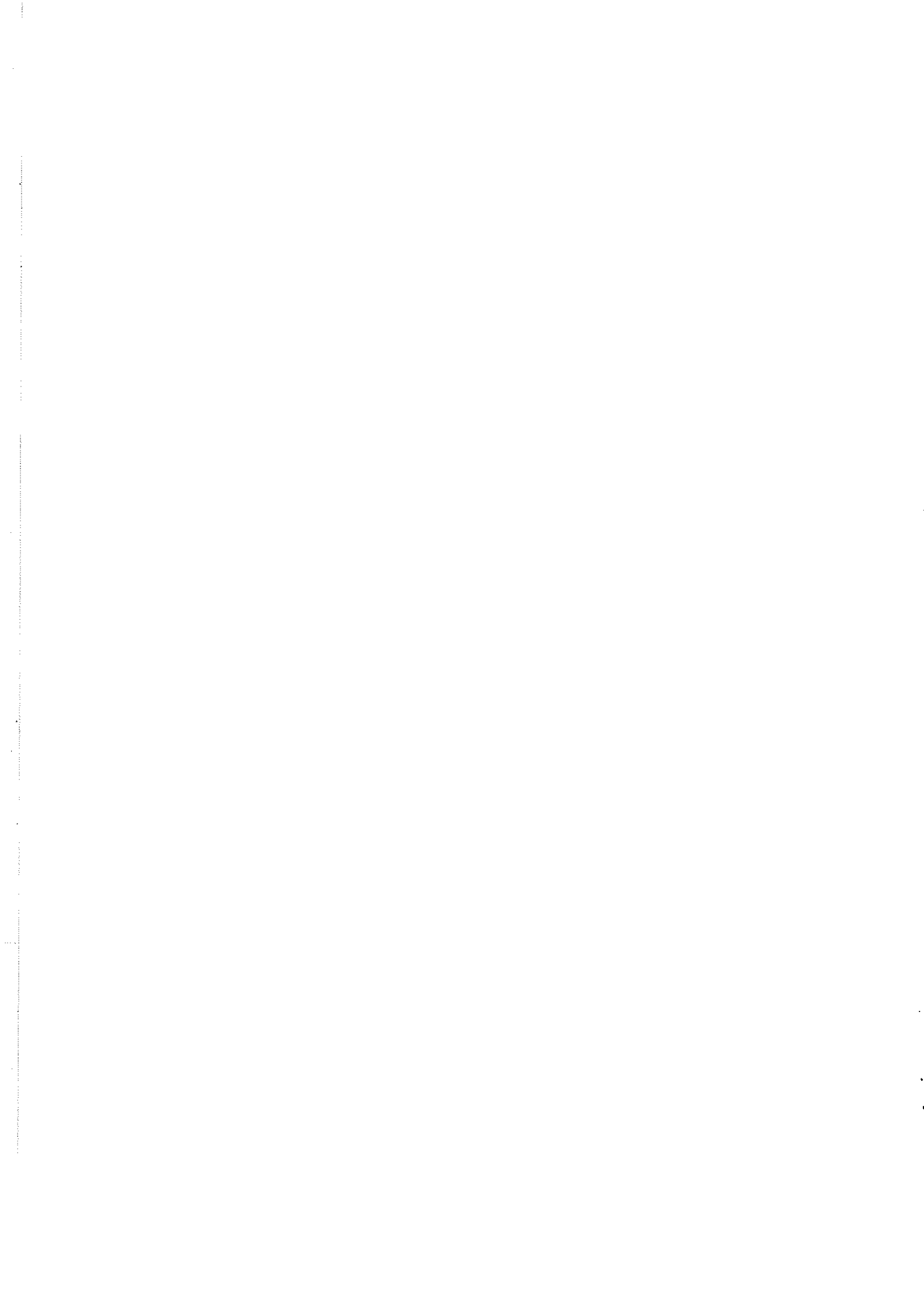
Je tiens à remercier Madame Maryse Baradat pour sa Science du nonylphénol et pour ses précieux conseils concernant les questions analytiques.

Enfin, d'une manière générale, je remercie tous les gens du laboratoire des xénobiotiques (Sophie, Mimi, Haïfa, Cécile, Elizabeth, Estelle, Gaëlle, Florence VIN-son, Mauricette, Raymonde, Christiane, et celles que j'oublie et aussi Daniel, Jean-Philippe, Patrick, Raymond, Georges etc etc...) ainsi que tous ceux que j'ai croisés pendant mes longues années d'étude... (Dont ma Coucouille, Eliette, P'tite Flo et les zautres...)

...Et à tous ceux grâce à qui je suis celui que je suis aujourd'hui...

Et mes remerciements et excuses pour les arbres qui ont fourni le papier de cette thèse.

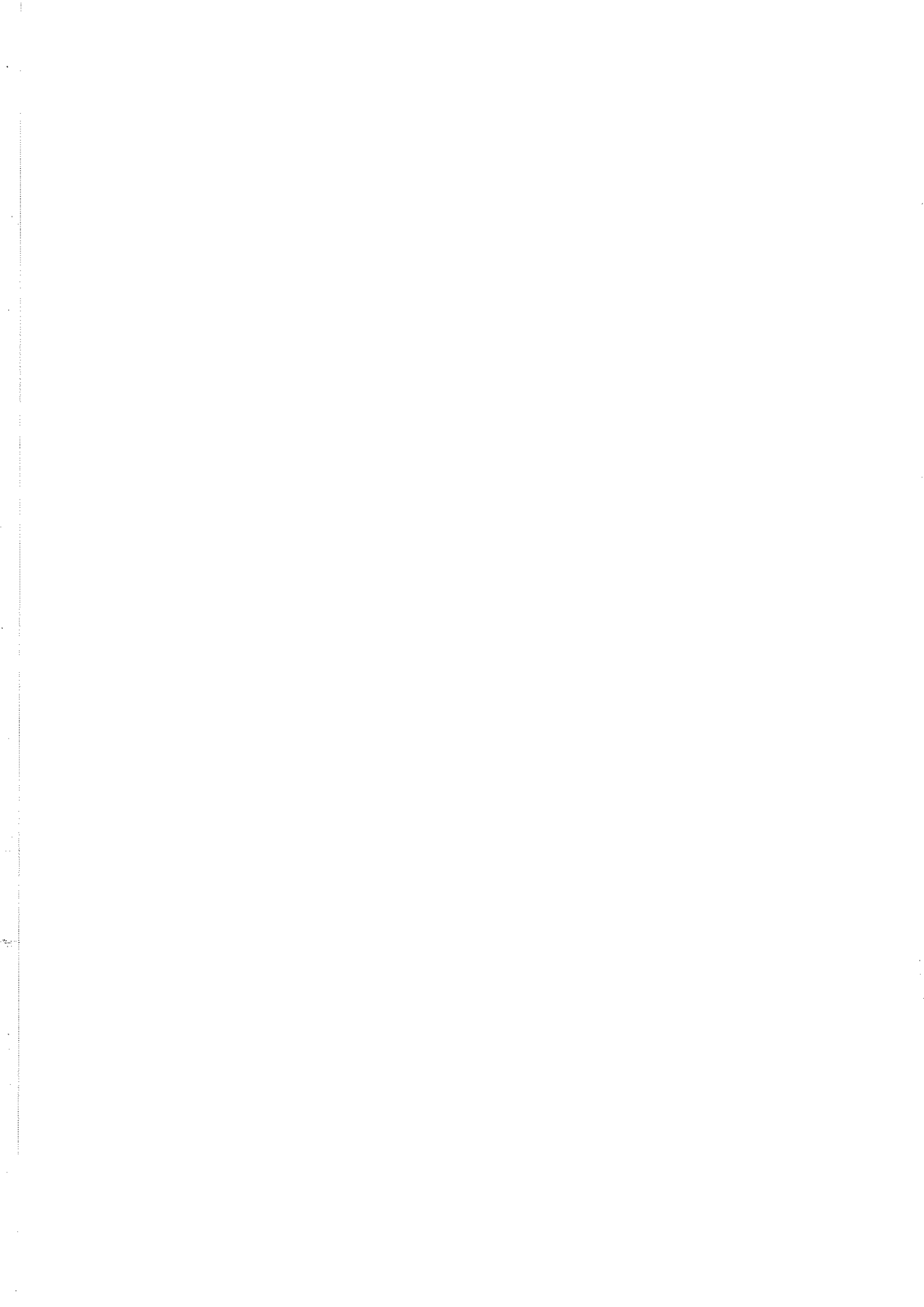
... Et aussi à... ben zut, y'a plus de place...



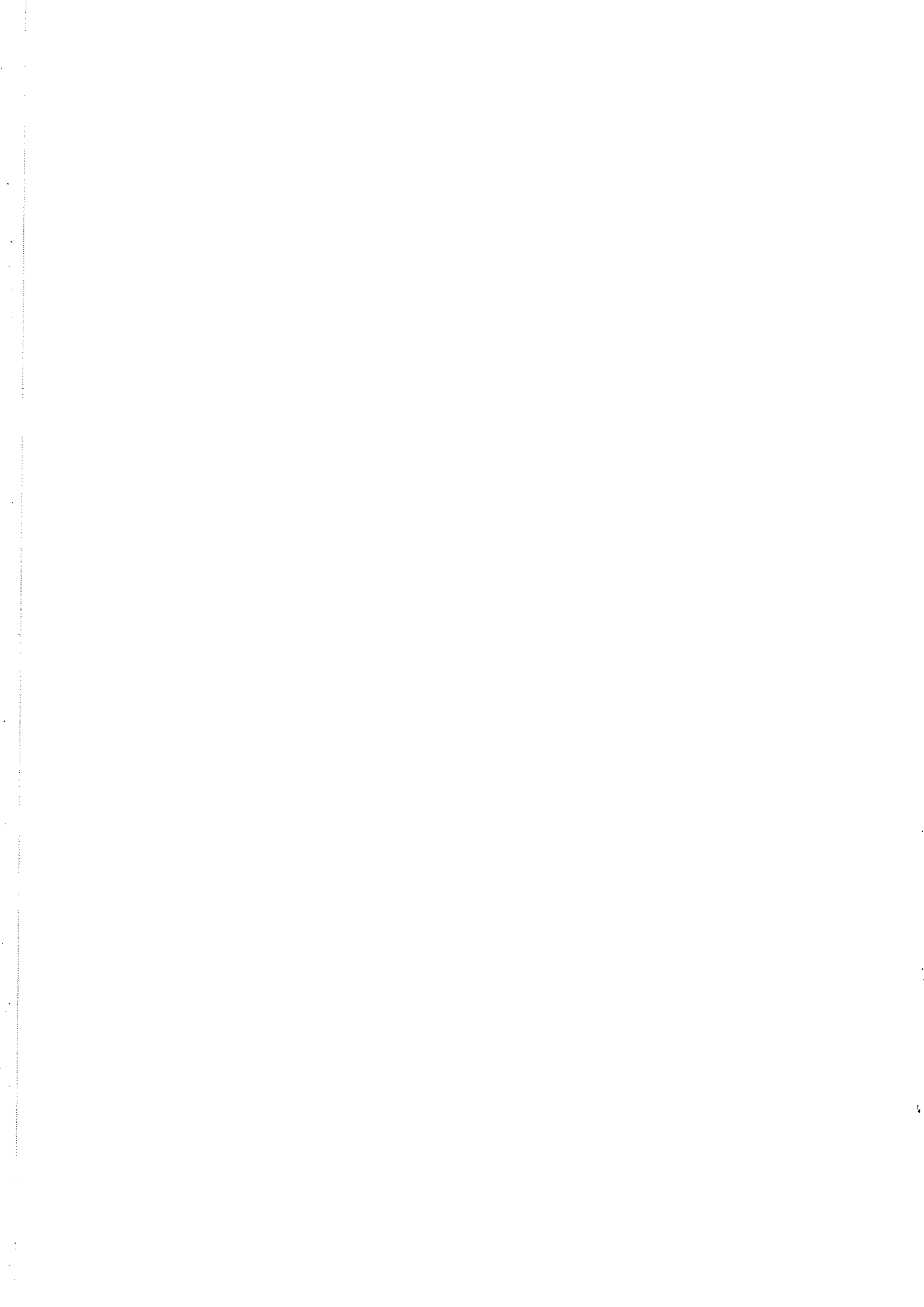
## Liste des abréviations utilisées

- 4-n-NP** : isomère *para*-substitué linéaire du NP
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AP** : alkylphénol
- APEO** : alkylphénol polyéthoxylé
- ARN** : acide ribonucléique
- BBP** : phtalate de butyle et de benzyle
- BPA** : bisphénol A
- Bq** : Bequerel, unité de mesure de radioactivité (1 Bq = 1 dps = 60 dpm)
- CE<sub>50</sub>** : concentration effective pour 50% des organismes exposés
- CL<sub>50</sub>** : concentration létale pour 50% des organismes exposés
- CL<sub>50</sub>96h** : concentration létale pour 50% des organismes soumis à une exposition de 96h
- CLHP** : chromatographie liquide haute performance
- CSL** : comptage en scintillation liquide
- DBCP** : dibromochloropropane
- DBP** : phtalate de dibutyle
- DDT** : dichloro diphényle trichloroéthane
- DDE** : 1,1-dichloro-2,2-bis(p-dichlorophényl)éthylène
- DES** : diéthylstilbestrol
- DHT** : dihydrotestostérone
- DMCS** : diméthylchlorosilane
- dpm** : désintégrations par minute
- E<sub>2</sub>** : 17-β-oestradiol
- FSH** : follicule stimulating hormone
- HAP** : hydrocarbure aromatique polycyclique
- HCB** : hexachlorobenzène
- LH** : hormone lutéinisante
- NOAEL** : No Observed Adverse Effect Level
- NOEC** : No Observed Effect Concentration
- NP** : nonylphénol
- NPEO** : nonylphénol polyéthoxylé
- OP** : octylphénol





**PBDE** : polybromodiphényléthers  
**PCB** : polychlorobiphényles  
**PNEC** : Predicted No Effect Concentration  
**ppb** : partie par milliard  
**ppm** : partie par million  
**RE** : récepteur à l'oestradiol  
**RIA** : radio immuno assay  
**RT-PCR** : reverse transcription-polymerase chain reaction  
**SHBG** : sex hormone binding globulin  
**SM** : spectrométrie de masse  
**STEP** : station de traitement des eaux et d'épuration  
**TBBPA** : tétrabromobisphénol A  
**TBG** : thyroxine binding protein  
**TBT** : tributylétain  
**TCDD** : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine  
**TGF** : Transforming Growth Factor  
**tr** : temps de rétention



# Sommaire

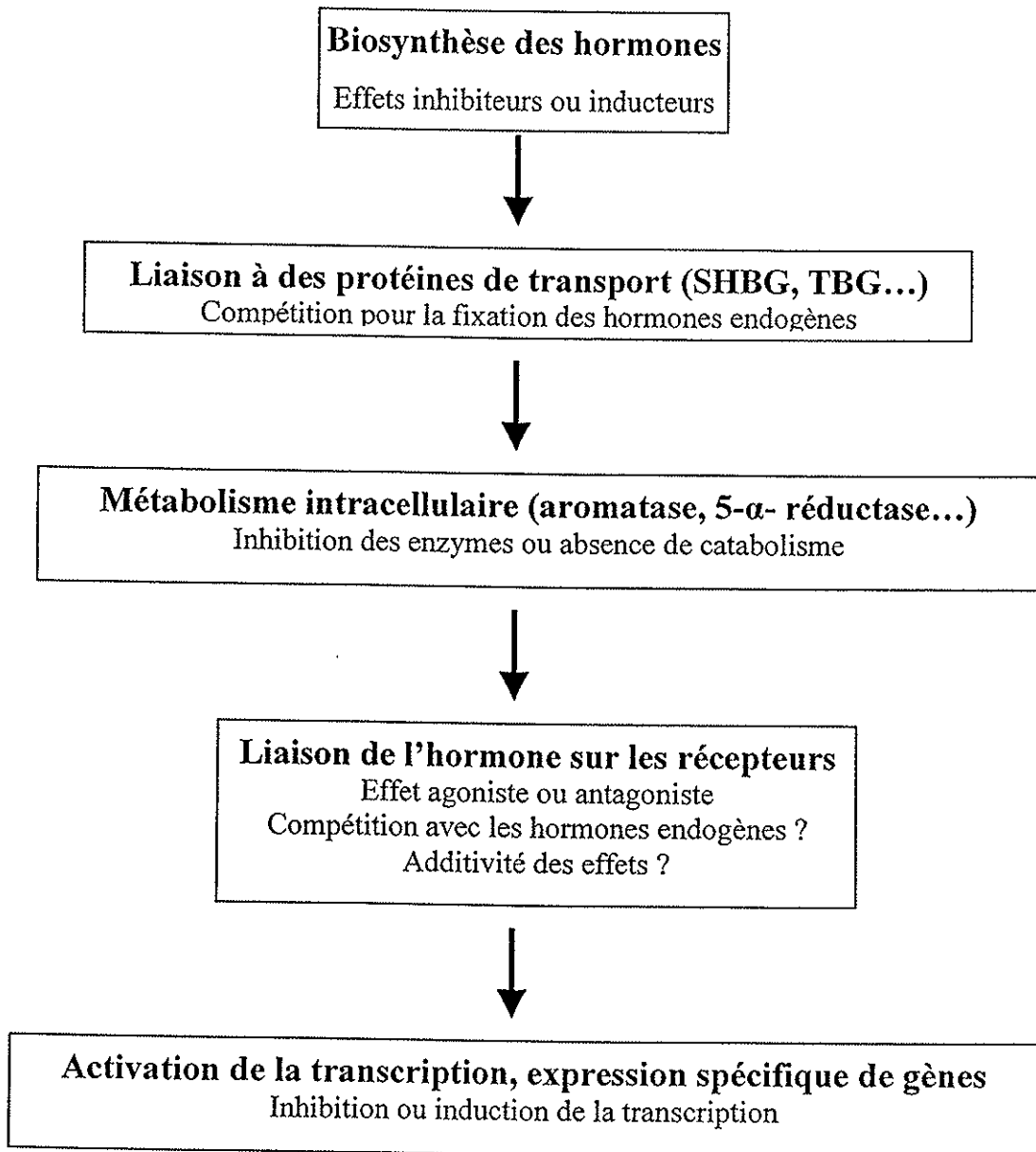
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>10</b>
<b><u>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b>	<b>14</b>
<b>I. Les perturbateurs endocriniens, introduction, définition</b>	<b>15</b>
1. Définitions	15
2. Historique et constat	16
3. L'hypothèse du TDS ou testicular dysgenesis syndrome	19
4. Exposition aux perturbateurs endocriniens et risques professionnels	20
<b>II. Revue des principaux perturbateurs endocriniens</b>	<b>21</b>
1. Les oestrogénomimétiques	22
2. Les perturbateurs des autres systèmes hormonaux	30
<b>III. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens</b>	<b>32</b>
1. Mécanismes d'action directe des oestrogénomimétiques	33
2. Mécanismes d'action indirecte	34
<b>IV. Relation structure-activité chez les perturbateurs endocriniens</b>	<b>37</b>
<b>V. Influence de l'âge et des phases du développement sur l'effet des perturbateurs endocriniens</b>	<b>39</b>
<b>VI. Peut-on parler d'une relation effet-dose pour les perturbateurs endocriniens ?</b>	<b>41</b>
<b>VII. Méthodes tests de l'activité hormonale des composés suspectés d'être des perturbateurs endocriniens</b>	<b>44</b>
1. Tests <i>in vitro</i>	45
2. Tests <i>in vivo</i>	49
3. Comparaison des méthodes tests de l'activité oestrogénique	52
<b><u>LE NONYLPHENOL, PRESENTATION</u></b>	<b>55</b>
<b>I. Le nonylphénol, présentation</b>	<b>56</b>
<b>II. Toxicité du nonylphénol</b>	<b>57</b>
1. Sur les organismes aquatiques	57
2. Sur les organismes végétaux	59
3. Chez les invertébrés terrestres	59





4. Chez les mammifères	60
<b>III. Des isomères à activité oestrogénique variable</b>	<b>61</b>
<b>IV. Pharmacocinétique et métabolisme du nonylphénol</b>	<b>62</b>
1. Sources possibles d'exposition au NP	62
2. Pharmacocinétique du nonylphénol chez l'homme	63
3. Métabolisme du NP chez le rat	64
<b>V. Rejet du nonylphénol dans l'environnement et sources de contamination</b>	<b>65</b>
1. sources de contamination	65
2. Contamination de l'environnement aquatique	65
3. Les boues de STEP, principale source de contamination du milieu terrestre	66
4. Dégradation et rémanence du NP dans les sols	67
<b>VI. Objectifs de l'étude</b>	<b>68</b>
<b><u>PARTIE EXPERIMENTALE</u></b>	<b>69</b>
<b>Introduction</b>	<b>70</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>72</b>
I. Matériel	72
II. Méthodes analytiques	74
III. Protocoles expérimentaux	76
<b>Résultats et discussion</b>	<b>80</b>
I. Etudes de métabolisme	80
II. Absorption du nonylphénol par les plantes	82
<b>Conclusion de la partie expérimentale</b>	<b>91</b>
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b>	<b>94</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>101</b>
<i>Bibliographie</i>	107
<i>Table des matières</i>	119
<i>Index des tableaux et figures</i>	123

**Figure 1b :** Les différents mécanismes d'action possibles des perturbateurs endocriniens  
(d'après Balaguer, 2001)

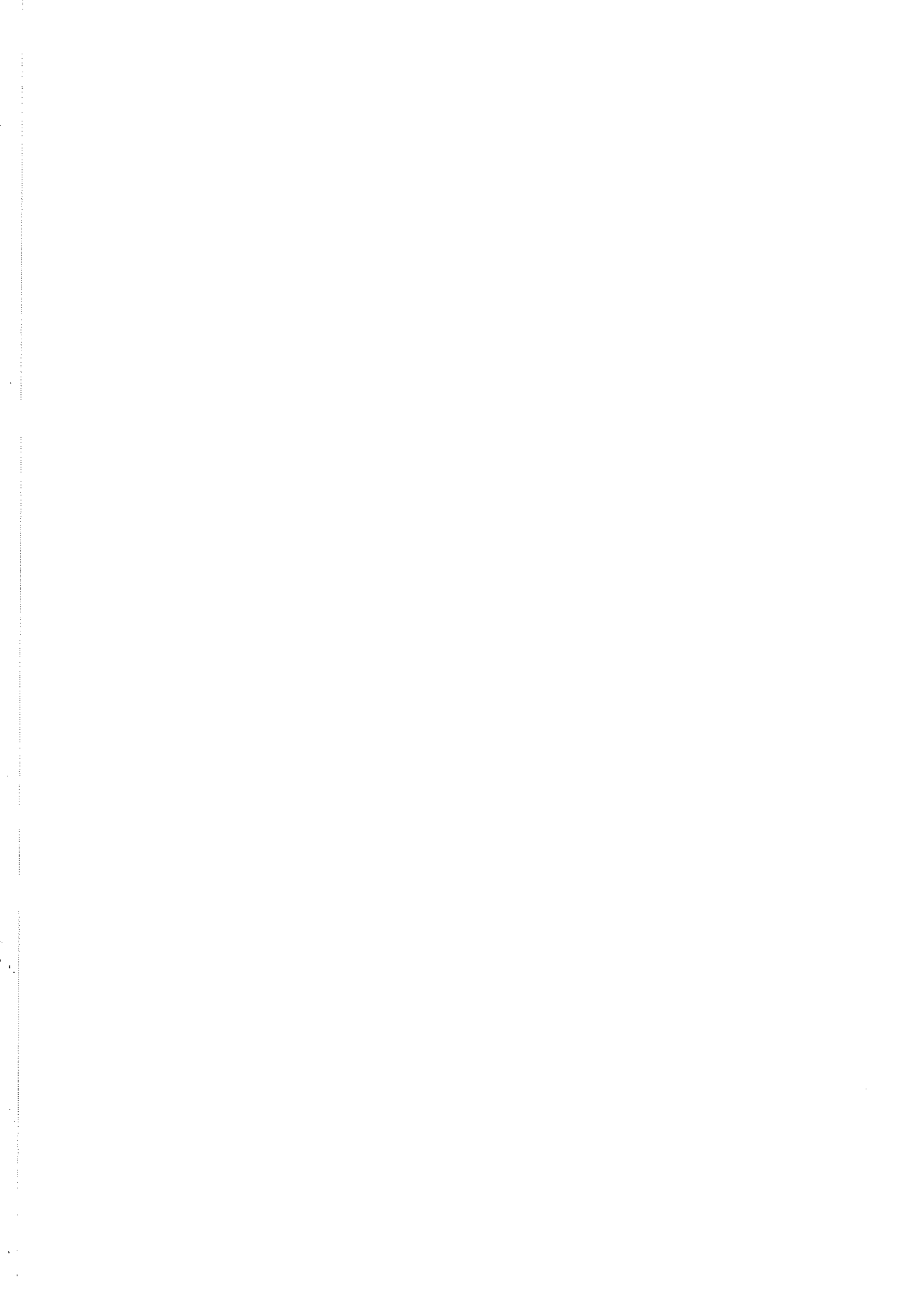


# INTRODUCTION

L'homéostasie d'un organisme, (le maintien des équilibres nécessaires à sa bonne santé) dépend étroitement de sa régulation par des hormones naturelles endogènes. Ces hormones sont normalement sécrétées par les glandes endocrines (parmi lesquelles on retrouve l'hypothalamus, la thyroïde, le pancréas, le foie ou encore les ovaires et les testicules). Les hormones sont libérées dans le sang pour exercer leur effet sur des organes ou des tissus cibles distants de l'organe sécréteur (glandes mammaires, squelette, système nerveux, organes de la reproduction...). De natures chimiques diverses (glycoprotéines, stéroïdes, catécholamines), elles agissent à de très faibles doses et présentent une forte affinité ainsi qu'une forte spécificité pour leurs récepteurs respectifs ; elles contribuent donc à assurer le maintien de l'homéostasie d'un organisme et jouent un rôle prépondérant dans sa réponse à des événements endogènes (croissance et développement sexuel par exemple) ou exogènes en stabilisant ou en équilibrant les fonctions de l'organisme. Les concentrations hormonales, influencées par les stades de développement de la vie d'un organisme autant que par des *stimuli* externes, sont régulées par des mécanismes complexes de rétroaction. Toute perturbation dans cet équilibre (figure 1b) peut occasionner des troubles ou des changements dans le comportement, le développement, la croissance, la reproduction de l'individu ou encore les mécanismes de défense des individus (atteintes du système immunitaire, développement de cancers...)

Il est maintenant avéré que plusieurs substances présentes naturellement ou synthétisées puis libérées par l'homme dans l'environnement génèrent des troubles de ce système. Si dans certains cas, des effets modulateurs des fonctions endocriniennes étaient recherchés, par exemple à des fins thérapeutiques (avec parfois des conséquences dramatiques dans le cas du diéthylstilbestrol), ces effets sont apparus dans la majorité des cas comme des activités secondaires et inattendues ; par exemple des molécules destinées à être utilisées comme pesticides ou encore comme détergents se sont révélées capables d'imiter (agonistes) ou au contraire de bloquer (antagonistes) l'activité de certaines hormones (Preziosi, 1998).

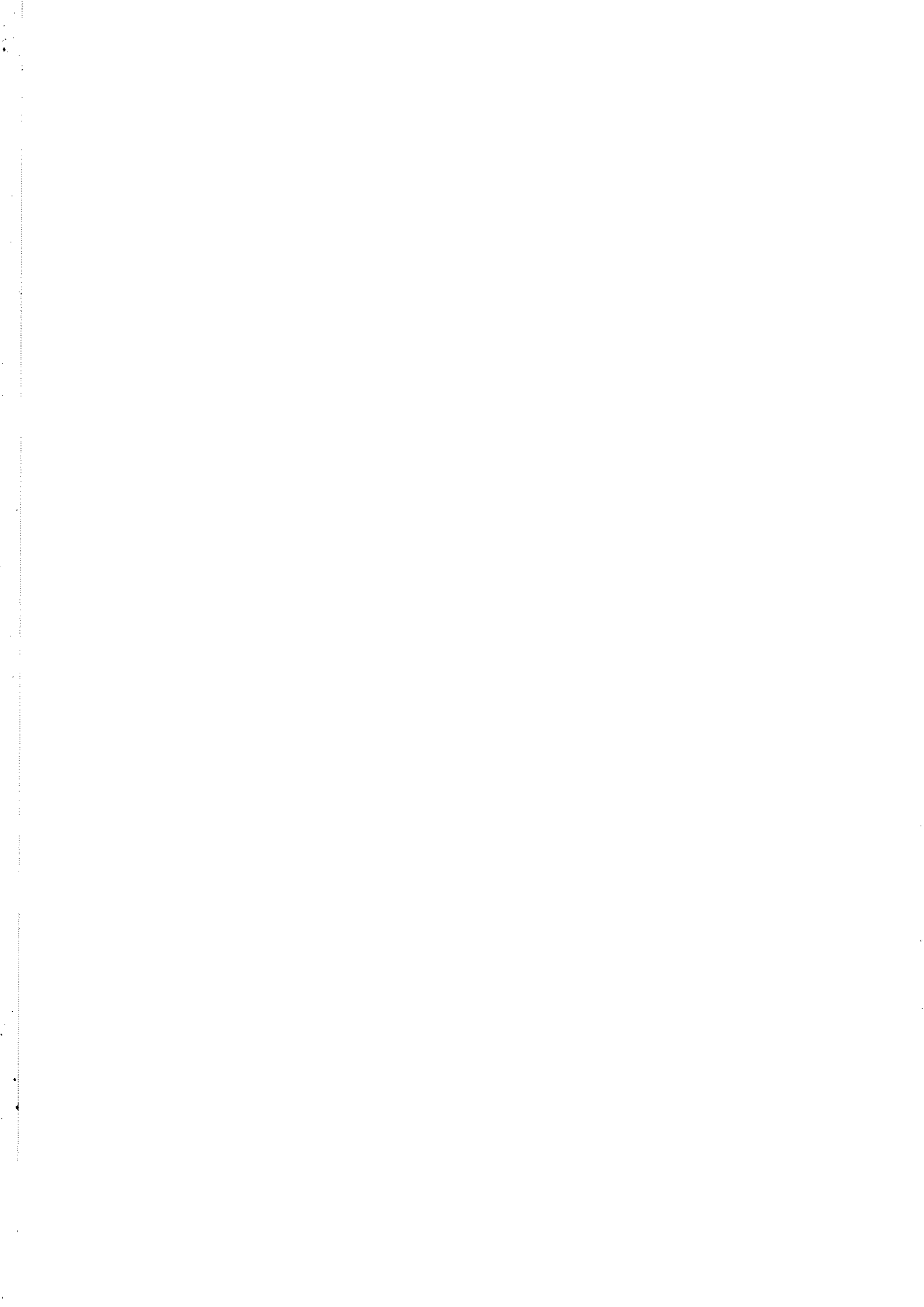
Ces composés sont désormais classés sous le terme de perturbateurs endocriniens. C'est l'observation à la fin des années 60 de graves troubles sur la faune sauvage et dans des



populations humaines qui a amené à s'interroger sur le possible impact de polluants environnementaux sur la santé animale et humaine. Sur la faune sauvage, l'impact de ces polluants s'est traduit par la diminution, voire la disparition, de plusieurs espèces. Ces atteintes se sont révélées être liées à des perturbations physiologiques générées par des polluants rejetés dans l'environnement du fait des activités humaines. Ces perturbations ont été répertoriées par Colborn *et al.* en 1993 :

- Fonctionnement anormal de la thyroïde chez les oiseaux et les poissons.
- Baisse de la fertilité des oiseaux, des poissons, des mollusques et des mammifères.
- Démasculinisation et féminisation des poissons, des oiseaux et des mammifères mâles.
- Déféminisation et masculinisation des poissons, des mollusques et des oiseaux femelles.
- Altération du fonctionnement du système immunitaire des oiseaux et des mammifères.

L'existence possible d'une relation entre ces composés et le développement de troubles de la santé sur les populations humaines a alors été suspectée: des atteintes des fonctions de reproduction et de la fertilité ont été décelés chez plusieurs populations de travailleurs (ainsi que leurs familles) exposés à de tels composés. Les premiers cas répertoriés concernaient les employés d'usines de fabrication d'un insecticide, la képone, qui présentaient une baisse de leur libido, ou encore les aviateurs qui larguaient du DDT sur les champs cultivés et pour lesquels une diminution du nombre de spermatozoïdes a été mise en évidence. De nombreuses études ont par la suite mis en exergue une augmentation de la survenue de troubles des fonctions de reproduction, notamment une augmentation du nombre de cancer des testicules et du sein, des malformations génitales, ainsi qu'une baisse de la fertilité chez certaines populations. Ces troubles pouvaient être mis en relation avec la présence dans l'environnement de substances chimiques perturbatrices du système endocrinien (Colborn et Clément, 1992). Dans la plupart des cas pourtant, le lien de cause à effet n'a pu être clairement établi, sauf dans le cas d'expositions massives au DDT ou à la chlordécone (képone) pour les populations humaines ; pour le tributylétain et les populations de



mollusques marins ou encore dans un registre non environnemental pour le diéthylstilbestrol (DES), composé qui a un temps été administré aux femmes enceintes.

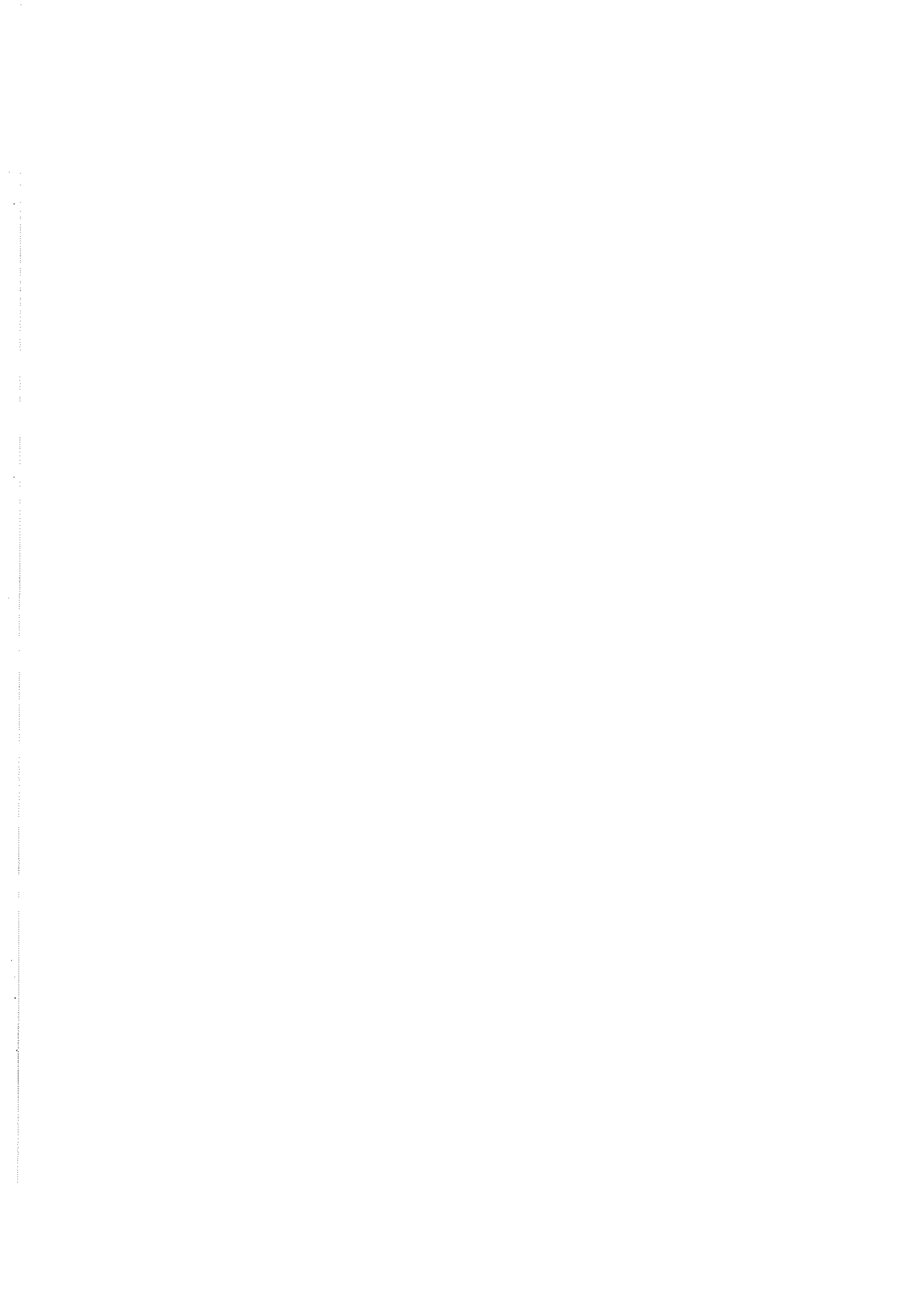
En 1995, un consensus a vu le jour au niveau international :

1. Les substances chimiques peuvent interagir et altérer le fonctionnement du système endocrinien.
2. Les connaissances manquent pour juger de l'étendue du problème et de ses conséquences pour l'Homme et l'Environnement.
3. Il est nécessaire de mieux étudier ces questions afin de réduire les incertitudes quant à l'évaluation des dangers, des niveaux d'exposition et des risques présentés par les perturbateurs endocriniens.

Ces dernières années ont donc vu un intérêt croissant se porter sur les perturbateurs endocriniens, leur investigation ainsi que l'élucidation de leurs mécanismes d'action ; en quelques années, la liste des composés perturbateurs endocriniens s'est allongée et comporte de nombreux produits aussi divers que des pesticides organo-chlorés, des retardateurs de flamme, des vernis pour conserves de nourriture, des adjuvants pour plastique alimentaire, des détergents, des peintures pour bateaux...

Parmi ces nombreux composés, on rencontre les alkylphénols polyéthoxylés, surfactants non ioniques qui entrent dans la composition des détergents industriels et qui sont également utilisés dans l'industrie du textile et du papier. Ces composés (et majoritairement le nonylphénol polyéthoxylé) présents dans les eaux usées et les effluents industriels sont biodégradés lors du traitement en station d'épuration. La dégradation par les bactéries de l'environnement et dans les stations d'épuration résulte en la formation de métabolites finaux que sont les alkylphénols. Du fait de leur caractère lipophile accru et de leur plus grande rémanence, ces alkylphénols (majoritairement du nonylphénol) sont retrouvés dans les effluents de ces stations mais surtout dans les boues générées par le traitement des eaux. Comme d'autres contaminants organiques de l'environnement (PCB, dioxines, DDT, phtalates...), le nonylphénol possède une activité de perturbateur endocrinien et plus particulièrement une activité oestrogénique, démontrée *in vitro* et *in vivo*.





Les effluents des stations d'épuration et ceux d'origine industrielle contaminent le milieu aquatique où les teneurs varient de quelques ppb dans l'eau des rivières à quelques ppm dans les sédiments (Ahel *et al.* 1994). Le recyclage des boues de station d'épuration (par la pratique de l'épandage dans les champs) ainsi que l'utilisation de formulations pesticides renfermant des alkylphénols polyéthoxylés entraîne une contamination du sol. Or, la croissance constante de la production de boues de station d'épuration ainsi que l'augmentation de la proportion de ces boues destinées à l'épandage pose donc non seulement la question de la contamination des sols par le NP (en Europe, ce risque est moindre, du fait de l'interdiction de son utilisation dans les détergents à usage ménager : seules les boues provenant de sites non industriels étant destinées à être épandues) mais aussi celle de son possible transfert vers les plantes de cultures et donc du risque de transfert à l'homme lors de la consommation de végétaux comme la carotte par exemple (Bokern et Harms 1999).

Les plantes ont la capacité de métaboliser les xénobiotiques, mais sont aussi susceptibles d'accumuler les polluants du sol, et de les conserver biodisponibles pour le consommateur. En ce qui concerne le nonylphénol, il est donc important, pour prévoir le risque encouru par le consommateur (homme ou animal), de déterminer d'une part sa capacité à être absorbé par les plantes d'intérêt agronomique, et d'autre part une éventuelle modification de cette absorption liée à la présence dans les sols de culture de boues de station d'épuration voire d'autres composés phytosanitaires.

Le travail effectué ici va donc s'attacher dans une première partie bibliographique à revenir sur la notion de perturbateurs endocriniens, à présenter leurs effets néfastes sur les organismes et notamment la santé humaine, à présenter les outils destinés à évaluer l'activité de ces composés ainsi qu'à tenter de comprendre leur mécanisme d'action pour en brosser un portrait le plus complet possible. Une deuxième partie d'ordre expérimental va s'attacher à étudier le comportement du nonylphénol en relation avec des plantes destinées à la consommation ainsi qu'à déterminer s'il existe un transfert effectif de ce composé depuis le sol vers la plante ; la mise en place des essais seront ensuite discutés. Dans la conclusion, nous reviendrons sur la validité des essais sur le nonylphénol et plus généralement sur les études réalisées jusqu'à présent sur les perturbateurs endocriniens ainsi que sur l'attitude à avoir envers les perturbateurs endocriniens.



**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**





# **I. Les perturbateurs endocriniens, introduction, définition :**

## **1. Introduction, définitions :**

Une hypothèse a été émise selon laquelle des contaminants chimiques pourraient jouer un rôle de perturbateurs endocriniens chez l'homme en provoquant des dysfonctionnements hormonaux (altérations de la synthèse, du catabolisme, de la sécrétion, du transport et des signaux de transduction des hormones), dysfonctionnements constatés par ailleurs chez diverses espèces d'animaux sauvages. Il est désormais avéré que de nombreux composés chimiques synthétisés par l'homme, utilisés à l'échelle industrielle et rejetés dans l'environnement depuis les années 50 agissent comme des perturbateurs endocriniens. Ces dernières années, l'intérêt attaché à la recherche et à l'étude des effets néfastes sur la santé humaine ou animale des polluants environnementaux s'est considérablement accru. L'origine en est l'observation d'une augmentation du nombre d'anomalies de la reproduction et du développement chez divers animaux en relation possible avec leur exposition à un large éventail de composés d'origine synthétique et de leurs dérivés retrouvés dans l'environnement en quantité de plus en plus importante, ces contaminants étant classés sous le terme de perturbateurs endocriniens.

Le terme « perturbateur endocrinien » désigne une substance exogène ou un mélange complexe de substances pouvant altérer les fonctions du système endocrinien et par conséquent causer des effets délétères sur la santé d'un organisme entier, de sa progéniture ou de sa population (Degen et Bolt, 2000). Vu la disparité des composés classés sous ce terme et la complexité de la problématique, plusieurs définitions ont vu le jour : pour l'EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening And testing Advisory Committee), une première définition retenue avait été celle de Kavlock (1996) « *An exogenous agent which interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action or elimination of natural hormones in the body which are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development or behavior.* ». Cette première définition, trop restreinte pour certains au milieu scientifique a été remaniée une première fois en la citation suivante : « *An exogenous substance that changes endocrine functions and causes adverse effects at the level of the organism, its progeny, and/or (sub)populations of organisms* » ; néanmoins une controverse sur la présence des termes « *adverse effects* » a conduit à formuler une nouvelle définition finalement retenue par

**Tableau 1 :** Exemples de relations cause à effet établies pour des perturbateurs endocriniens et effets pour les humains et la faune sauvage (d'après Gray *et al.* 2003).

Organisme	Composé incriminé et effets sur l'organisme
<b>Humain</b>	DES et troubles de la grossesse, troubles de la fertilité, atteinte bi-générationnelle
	PCB et troubles du développement
	Ethinylestradiol et troubles des fonctions de la reproduction
	Chlordécone associée à une baisse de la testostérone sérique et à de troubles de la fertilité
	DBCP et infertilité
	Mitotane*, atteinte des fonctions surrénales et troubles de la fertilité
	Phyto-oestrogènes et troubles du cycle menstruel
<b>Animaux domestiques</b>	Permixon* et atteintes prostatiques
<b>Faune sauvage</b>	Phyto-oestrogènes, mycotoxines, PCB et TCDD
	PCB, TCDD et diminution des populations d'oiseaux piscivores
	Métabolites du DDT (p,p'-DDE) et fragilisation de la coquille des œufs d'oiseaux et de reptiles
<b>Faune sauvage</b>	PCB et TCDD, déclin de populations de visons et de mammifères dans la région de grands lacs
	DDE et atteinte de populations d'alligators (lac Apopka), réduction de la taille du phallus et développement anormal des gonades
	HAP et altération du développement ovarien, de la viabilité des œufs et des larves de poissons plats
	Peintures anti-corrosion (tributylétain) et populations de bulots
	Effluents d'industrie textiles et baisse du taux de stéroïdes, diminution de la taille des gonades chez des populations de poisson (Surgeon blanc)

cet organisme : « *The EDSTAC describes an endocrine disruptor as an exogenous chemical substance or mixture that altersthe structure or function(s) of the endocrine system and causes adverse effects – at the of the organism, its progeny, populations or subpopulations of organisms – based on scientific principles, data, weight-of-evidence, and the precautionary principle* ». Le comité scientifique Européen SCTEE (Scientific Comitte on Toxicity, Ecotoxicity and the Environnement) en a pour sa part donné la définition suivante en 1998 : « *An endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations* ».

Une définition classique des perturbateurs endocriniens est celle donnée par F. Metzger de l'INRS : « *les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle qui peuvent interférer avec la synthèse, le stockage, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles. Elles sont susceptibles de modifier le fonctionnement d'une partie du système endocrinien et d'avoir des conséquences sur la reproduction et le comportement* ».

## **2. Historique et constat :**

Historiquement, le premier composé mis en cause a été le DDT (pesticide organochloré) suite à la mise en évidence de ses effets oestrogéniques : baisse de la libido et de la fécondité chez des travailleurs exposés à ce produit (Singer, 1949 ; Guzelian, 1982) et atteinte du système reproducteur mâle et femelle de populations de goélands du lac (Colborn *et al.* 1993 ; Fry *et al.* 1987). Cette dernière atteinte a été mise en évidence suite à l'observation de la diminution de populations d'oiseaux piscivores et corrélée à l'alimentation de ces derniers en poisson contaminé par le DDT. Le DDT est un pesticide organochloré de la classe des dichlorodiphénylétanes, (parmi laquelle on compte aussi le DDD, le DDE, le diclofol et le méthoxychlor), qui a été massivement utilisé comme insecticide à partir de 1940. Son utilisation n'a été interdite qu'en 1960 dans les pays d'Europe de l'Ouest et seulement 12 ans plus tard aux USA. Cependant, du fait de son faible coût et de son apparente innocuité à court terme, le DDT continue d'être utilisé dans les pays en voie de développement. D'autres exemples ont ensuite confirmé l'implication de certains pesticides dans des troubles du développement sexuel observés dans la faune sauvage (tableau 1). Dans le lac Apopka en



**Tableau 2 :** Effets attribués à l'exposition au DES sur le système reproducteur en fonction du sexe des individus et de la période d'exposition (d'après Damgaard, 2002).

Période d'exposition	Effets du DES sur le système reproducteur
Femmes exposées pendant leur grossesse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avortement spontané</li> <li>• Naissance prématurée</li> <li>• Mort néonatale du fœtus</li> </ul>
Femmes exposées <i>in utero</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Malformations et anomalies structurales (Adénome, hypoplasie vaginale, malformation du col de l'utérus et/ou des ovaires)</li> <li>○ Adénocarcinome des cellules claires vaginales</li> <li>○ Atteinte de la fertilité et irrégularités du cycle menstruel</li> <li>○ Troubles de la grossesse (Grossesse extra-utérine, avortement spontané, mort néonatale du fœtus).</li> </ul>
Homme exposé <i>in utero</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Malformations et atteintes génitales (Cryptorchidie, hypoplasie des testicules et du pénis, kystes de l'épididyme)</li> <li>▪ Diminution de la qualité du sperme</li> </ul>

Floride, les tortues et les alligators juvéniles montraient des anomalies de développement des gonades (*ovo-testis*) ainsi que des concentrations plasmatiques de testostérone diminuées chez les mâles et des concentrations plasmatiques d'oestradiol augmentées chez les femelles ; des composés perturbateurs endocriniens tels que le DDE (métabolite du DDT) sont incriminés. En Floride toujours, une baisse de la fertilité des panthères mâles a été associée à une pollution de l'environnement par des composés organochlorés (PCB et DDE). On peut citer aussi le cas des hexachlorobenzènes, composés qui ont été utilisés comme fongicides mais dont la commercialisation a rapidement été interdite. Malgré tout, aux USA ces composés ont été utilisés de 1972 à 1985. Les hexachlorocyclohexanes comme le lindane ont été utilisés dans l'agriculture en tant qu'insecticides entre 1940 et 1978.

Les contaminants environnementaux ne sont pas les seuls exemples de perturbateurs endocriniens avérés : un autre exemple très connu témoigne des tragiques effets d'une substance synthétisée et administrée à des fins médicales, le diéthylstilbestrol (DES). Le DES a été administré à des millions de femmes entre les années 1945 et 1971, pendant leur grossesse, afin de limiter les risques d'avortement. Son utilisation a par la suite été suspendue lorsqu'une équipe de chercheurs (Herbst *et al.* 1971) rapportèrent un accroissement de la fréquence de l'adénocarcinome des cellules claires du vagin chez les filles exposées *in utero* au DES (tableau 2). Le DES a également été reconnu responsable d'anomalies du col de l'utérus, du vagin et des trompes de Fallope ainsi que de cycles menstruels irréguliers et d'une diminution de la fertilité (Golden *et al.* 1998). Enfin, chez les enfants mâles nés des femmes traitées au DES, il a été montré une augmentation de l'incidence d'anomalies telles que cryptorchidie (absence de descente complète ou incomplète d'un ou deux testicules dans les bourses ; pouvant aboutir à l'infertilité en cas d'absence de traitement chirurgical), hypospadias (malformation des voies urinaires masculines dans laquelle l'urètre s'ouvre sur la face inférieure de la verge), cancer des testicules et baisse de la qualité du sperme (Sharpe et Skakkebaek, 1993). Les oestrogènes synthétiques actuels utilisés dans la contraception orale ou l'hormonothérapie substitutive postménopausale sont également suspectés : des études ont rapporté un risque plus élevé de développement du cancer du sein chez les femmes utilisant un contraceptif oral (Golden *et al.* 1998). Des études sont actuellement en cours afin de déterminer le potentiel perturbateur de ces oestrogènes ou de leurs métabolites et de leur éventuel impact sur la santé humaine.



En parallèle à ces exemples, des études couvrant une période d'une cinquantaine d'années ont mis en évidence une baisse importante (40%) de la fertilité masculine (Sharpe, 1993 ; Sharpe et Skakkebaek, 1993) ; ce point reste cependant controversé, notamment à cause des différences observées entre les populations, et du fait de l'existence de certains biais statistiques, concernant par exemple la sélection des individus entrant dans ces études. Une méta-analyse réalisée par Carlsen *et al.* (1992) sur 61 articles a conclu que la concentration spermatique avait diminué de 1% par an au cours de ces 50 dernières années. Il a été suggéré que ces atteintes pouvaient être associées à de possibles expositions à des contaminants chimiques ayant des propriétés oestrogéniques auxquels on a donné le nom de xéno-oestrogènes. Cette analyse a largement été critiquée, notamment du fait de l'existence de biais au niveau méthodologique (Olsen *et al.* 1995). Pourtant, après avoir éliminé les biais et reconsidéré les observations, Jouannet *et al.* (2001) concluaient que cette baisse ne pouvait s'expliquer que comme la seule conséquence de la méthodologie mais impliquait l'intervention de facteurs génétiques ou environnementaux. Une diminution annuelle de 2.1% de la concentration spermatique entre les années 1973 et 1992 a été rapportée par Auger *et al.* (1995), ainsi qu'une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. D'autres études menées dans d'autres pays (Suominen et Vierula, 1993) et qui ne rapportent pas les mêmes résultats suggèrent qu'il existe néanmoins d'importantes variations géographiques. Une augmentation des cas de cryptorchidie et d'hypospadias a également été rapportée chez les jeunes garçons (Burdorf et Nieuwenhuijsen, 1999). Dans ce dernier cas, ces deux malformations sont considérées comme étant des indices liés à une perturbation ayant eu lieu au cours du développement des organes sexuels. Pour certains chercheurs (Harrison *et al.* 1997), elles pourraient être le résultat d'altérations des fonctions de régulation des hormones sexuelles et ou de leur métabolisme *in utero* par des composés exogènes. D'une manière plus générale, l'augmentation de l'incidence des troubles cités précédemment serait due à l'exposition à des perturbateurs endocriniens (Colborn *et al.* 1993 ; Guillette *et al.* 1994). On retrouve parmi les composés suspectés, outre le DDT, des molécules comme les polychlorobiphényles, le bisphénol-A, retrouvé dans la composition des résines époxy et polyesters, les phtalates et le nonylphénol (NP) utilisés dans la fabrication des plastiques ou encore divers pesticides.

Actuellement, certains scientifiques considèrent que l'exposition de l'homme à des substances présentes dans l'environnement (eau, alimentation, air) et capables d'interagir avec l'appareil endocrine, entraînerait l'apparition de certains troubles fonctionnels et

# SCHEME OF THE PROJECT STEPS FOR ESTABLISHING A PRIORITY LIST OF SUBSTANCES (European Community, 2000)

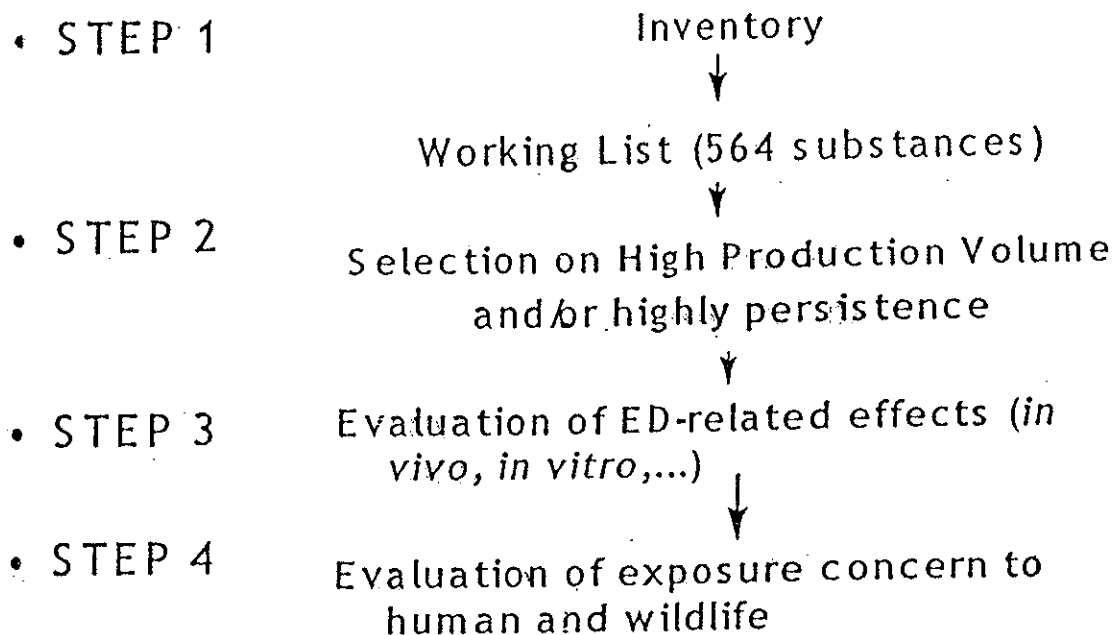


Figure 1 : Projet Européen de l'établissement d'une liste de composés prioritaires à évaluer concernant leur impact au niveau environnemental.

notamment de la reproduction (Juberg, 2000 ; Solomon et Schettler, 2000). Dans la majorité des cas cependant, un parallèle entre une exposition a des composés chimiques et des troubles des fonctions du système endocrine est observé mais il n'existe pas de preuve tangible d'une corrélation entre les deux. C'est d'ailleurs un des principaux sujets de controverse entre le milieu scientifique et le monde industriel. Un exemple marquant de ce conflit d'intérêt est celui de la CEE qui a établi une liste de composés à étudier (Figure 1) et considérés comme prioritaires en fonction entre autres de leurs tonnages de production, de leur rémanence et/ou de leur bioaccumulation ; l'industrie chimique, considérant que ces listes étaient établies de manière erronées a décidé de suspendre le partage des informations sur ces produits.

Des relations de cause à effet ont cependant été mises en évidence pour certains composés : la culpabilité du DES ne fait plus de doute, la relation entre l'exposition des travailleurs à la chlordécone et au dibromochloropropane (DBCP) et une atteinte des fonctions de reproduction a été prouvée ; les travailleurs exposés à de fortes concentrations de pesticides organochlorés ont montré des troubles nerveux ainsi que des atteintes testiculaires. Une exposition *in utero* aux PCB entraîne chez les enfants des troubles du comportement et des troubles de la reproduction.

### **3. L'hypothèse du TDS ou Testicular Dysgenesis Syndrome :**

Pour certains chercheurs enfin, hypospadias, cancer des testicules et diminution de la qualité du sperme ne seraient que des manifestations diverses d'un même syndrome : le TDS ou Testicular Dysgenesis Syndrome (Damgaard *et al.* 2002).

Le TDS pourrait avoir une origine génétique mais serait aussi profondément lié à l'incidence de facteurs environnementaux. Le rôle de ces derniers a été mis en évidence par des études épidémiologiques et la détermination de relations géographiques et temporelles avec les symptômes apparentés au TDS. Ce syndrome semble être fortement corrélé à des atteintes du développement des organes sexuels durant la période fœtale causées par des expositions à des agents perturbateurs exogènes.



Une relation entre le degré de sévérité du TDS et le développement de cancers des testicules a été envisagée : plus le nombre de symptômes associés au TDS est élevé, plus l'incidence des cancers associés est élevée, néanmoins l'incidence du TDS diminue avec le degré de sévérité (Skakkebaek *et al.* 2001).

**4. Exposition aux perturbateurs endocriniens et risques professionnels :** (Pillière, 2002).

Les premiers effets suspectés des perturbateurs endocriniens ont été observés chez des populations de travailleurs. Les risques liés à une exposition professionnelle à de tels contaminants sont donc maintenant largement étudiés. De telles études en milieu professionnel doivent néanmoins s'entourer d'un certain nombre de précautions : les expositions à des perturbateurs endocriniens peuvent provenir d'origines variées, du fait de la grande disparité de ces produits (médicaments, pesticides, solvants...). Une des principales difficultés rencontrées provient du fait que les expositions professionnelles sont le plus souvent multiples, ce qui complique l'établissement d'un lien de causalité entre un produit et le trouble observé. Enfin, ces expositions étant souvent des expositions à fortes doses et pour lesquelles il n'est pas démontré que les mécanismes d'action et les effets sont les mêmes qu'à faible dose, il convient de rester prudent quand à l'extrapolation des résultats à des expositions en milieu non professionnel.

Une étude en milieu professionnel peut être menée en fonction du produit chimique, en fonction de sa famille chimique, ou bien en fonction des secteurs ou des postes de travail. L'interprétation des résultats doit s'entourer de certaines précautions :

- Si une corrélation entre une exposition à un produit et l'apparition de troubles est observée, il faut néanmoins en déterminer le mécanisme d'action (par des dosages hormonaux par exemple) avant d'affirmer qu'il s'agit d'un mécanisme de perturbation endocrinienne.
- Des études négatives en milieu professionnel ne présentent en rien de résultats obtenus sur la population générale.
- A l'inverse des résultats positifs dans le milieu professionnel sont souvent liés à une forte exposition aux produits et ne permettent pas de conclure simplement en terme de risque pour la population générale.



**Tableau 3 :** Atteintes des fonctions endocriniennes de travailleurs suite à l'exposition professionnelle à des perturbateurs endocriniens

Exposition	Atteintes observées
Dibromochloropropane (DBCP)	Azoospermie, oligospermie Augmentation des taux de LH et de FSH Déficit en naissances mâles
Chlordécone	Oligospermie Diminution de la mobilité des spermatozoïdes
Carbaryl	Diminution de la qualité du sperme
Vinclozoline	Oligospermie
DDT	Oligospermie
<i>para</i> -nitrophenol	Augmentation de la LH Diminution de la mobilité des spermatozoïdes Oligospermie
Acide 2,2-disulfonique	Impuissance
Ethers de glycol	Diminution de la fertilité
Progestérone	Gynécomastie Anomalies du sperme
Ethinyl oestradiol	Gynécomastie Impuissance
Acétoxyprogestérone	Troubles de la libido Douleurs testiculaires
Corticostéroïdes	Nausées, vomissements Syndrome de Cushing Hypertension artérielle
Chrome	Diminution de la fertilité Diminution de la qualité du sperme
Plomb	Diminution de la qualité du sperme

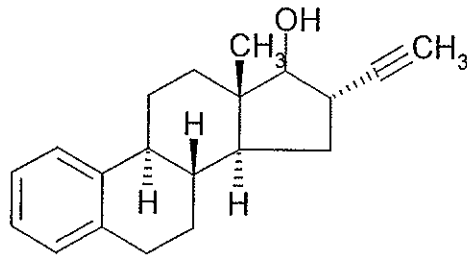
Des études ont été réalisées chez les agriculteurs et les applicateurs de pesticides pour rechercher l'existence d'un lien entre ces produits et le développement de cancers hormono-dépendants. Chez les agriculteurs, la plupart des études ne montrent pas d'excès de risque ou bien des excès de risque non significatifs pour les cancers des testicules, du sein, de l'endomètre et de la thyroïde. Pour les cancers de l'ovaire, les résultats de différentes études se contredisent avec des résultats positifs et d'autres qui ne le sont pas. Chez les applicateurs de pesticides considérés comme plus exposés, le risque de développer un cancer de la prostate semble plus élevé ; une relation dose-effet entre l'exposition et l'apparition de cancer a été retrouvée mais dans une seule étude. Dans le cas du cancer des testicules, il n'est pas retrouvé d'association significative avec l'application de pesticides, mais l'association devient positive dans le cas des cancers ovariens.

Les auteurs de ces études concluent cependant que les agriculteurs et les applicateurs de pesticides présentent une plus grande incidence de certains cancers hormonaux, en particulier de la prostate ; néanmoins, ni les pesticides en cause ni les niveaux d'exposition n'ont pu être évalués ; des investigations complémentaires sont par conséquent nécessaires (Pillière 2002). Le tableau 3 montre diverses atteintes observées chez des travailleurs exposés.

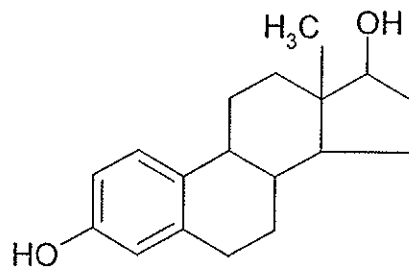
## **II. Revue des principaux perturbateurs endocriniens :**

### **1. Les oestrogénomimétiques :**

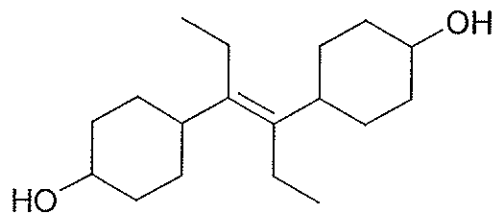
Les oestrogénomimétiques comptent parmi les perturbateurs endocriniens les plus nombreux et les plus étudiés. Les oestrogénomimétiques peuvent être définis comme des molécules dont les effets vont interférer avec ceux des oestrogènes, et qui vont initier ou inhiber une cascade d'effets cellulaires et tissulaires similaires à ceux déclenchés par les oestrogènes endogènes ; on classe aussi sous cette dénomination des composés dont les effets sont proches de ceux des oestrogènes mais dont l'action découle d'une liaison aux récepteurs aux oestrogènes ou d'une interférence avec la synthèse, la sécrétion, le transport ou l'élimination des oestrogènes.



Ethinyloestradiol



17-β-oestradiol



Diéthylstilbestrol

Figure 2 : Structures chimiques de l'oestradiol et de deux œstrogènes synthétiques.

### 1.1 Les oestrogènes synthétiques :

Parmi ces composés, le plus connu reste le DES dont nous avons parlé plus haut ainsi que les oestrogènes synthétiques utilisés dans la contraception hormonale et dans l'hormonothérapie substitutive postménopausale. Ces composés sont généralement très puissants : le DES est en effet capable de se lier au récepteur à l'oestradiol (RE) avec une affinité similaire à celle de l'oestradiol et de stimuler de manière 10 fois plus importante la prolifération de cellules MCF-7 pour des concentrations 10 fois plus faibles que celle de l'oestradiol.

Les oestrogènes synthétiques, plus récemment et très largement utilisés pourraient représenter une source importante de contamination : le 17- $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) utilisé dans les contraceptifs oraux est éliminé dans les urines après métabolisation en dérivé conjugué à l'acide glucuronique et se retrouve dans les effluents et les eaux usées ; or les bactéries présentes dans les stations d'épuration (STEP) dégradent les liaisons esters des conjugués et réactivent le composé parent (comme cela a été montré par Ternes *et al.* en 1999). Ce dernier, contrairement au composé naturel le 17- $\beta$ -oestradiol qui lui est inactivé en l'espace de 24 heures par les bactéries de l'environnement, n'est dégradé que lentement dans l'environnement et est susceptible d'exercer son activité oestrogénique sur plusieurs semaines (Tabak *et al.* 1970). Une équipe de chercheurs allemands (Kuch *et al.* 2001) a détecté la présence de stéroïdes dans des eaux de rivières et ont conclu que des oestrogènes non dégradés dans les STEP se retrouvaient dans le compartiment aquatique.

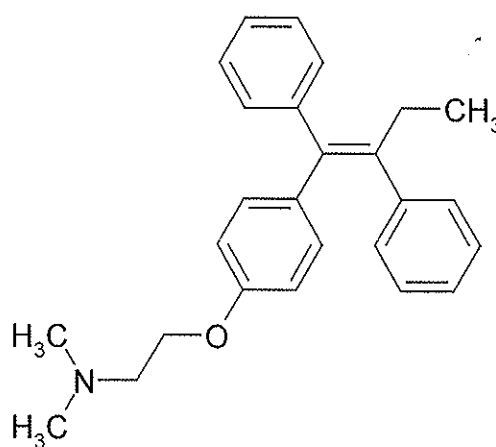
### 1.2 Les composés oestrogéniques à visée thérapeutique :

*Le mitotane (o,p'-DDT) :*

L'o,p'-DDT est l'un des principaux métabolites du DDT, il a été montré que ce composé altérait la fonction des glandes surrénales et pouvait donc être utilisé à des fins thérapeutiques pour traiter l'hypersécrétion et les tumeurs surrénales. De plus, il a été montré que de faibles doses de ce composé ont restauré des cycles menstruels réguliers chez des femmes atteintes de troubles du cycle associés à une hypertrichose.

**Tableau 4 :** Exemples de composés à usage clinique et mécanismes par lesquels ils peuvent agir avec le système endocrinien (d'après Preziosi, 1998).

Composé	Mécanisme envisagé	Site d'action	Usage clinique
Thioamides	Inhibition de la synthèse hormonale	Thyroïde	Hyperthyroïdie
Mitotane (o,p'-DDT)	Cytotoxicité spécifique (atrophie surrénale)	Cortex surrénalien	Carcinome des glandes surrénales
Streptozocine	Cytotoxicité spécifique au niveau du pancréas	Cellules $\beta$ du pancréas	Carcinome des îlots de Langherans
Aminoglutetimide	Inhibition du métabolisme de l'aromatase	Tissu adipeux extra surrénalien	Cancer du sein métastatique
Finastéride	Inhibition du métabolisme hormonal, blocage de la 5- $\alpha$ -réductase	Prostate et tissus DHT-dépendants	Hypertrophie bénigne de la prostate



**Figure 3 :** Structure du Tamoxifène

### *Le tamoxifène :*

Le tamoxifène (NOLVADEX\*, TAMOFENE\*) est un produit utilisé dans le traitement des carcinomes mammaires, son activité a été prouvée dans les tumeurs sensibles aux oestrogènes, mais reste non démontrée chez les patientes négatives pour les récepteurs aux oestrogènes. Le tamoxifène présente en plus un effet oestrogénique sur plusieurs tissus tels l'endomètre ou l'os (il entraîne une diminution de la perte osseuse post-ménopausique) et sur les lipides sanguins (diminution du LDL cholestérol).

### *Le torémifène :*

Le torémifène (FARESTON\*) est un composé de structure non stéroïdienne dérivé de la famille du triphényléthylène. Ce composé se lie spécifiquement et de manière compétitive aux récepteurs aux oestrogènes ; cela se traduit par une inhibition de la synthèse d'ADN induite par les oestrogènes. Comme pour le tamoxifène, le torémifène possède à la fois une activité oestrogénique et une activité anti-oestrogénique (on retrouve parfois les deux activités associées), son comportement dépend de la dose, de la durée du traitement, de l'espèce animale considérée (pour les tests *in vivo*), du sexe et de l'organe considéré.

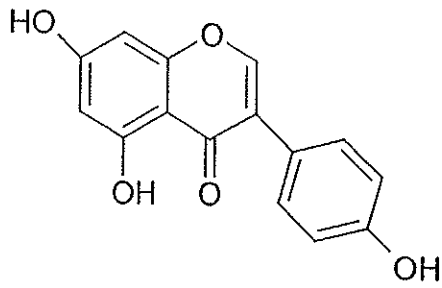
### *Le finastéride :*

Le finastéride (CHIBRO PROSCAR\*) est un composé utilisé à des fins thérapeutiques dans le traitement des hypertrophies bénignes de la prostate. Ce composé est un inhibiteur de la 5- $\alpha$ -réductase, enzyme responsable de la biotransformation de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), hormone dont dépend le développement de la prostate. L'inhibition de l'enzyme provoque une chute des taux de DHT intraprostatique et circulante, entraînant une amélioration des symptômes liés à l'adénome prostatique. Le finastéride n'a pas d'affinité pour les récepteurs androgéniques.

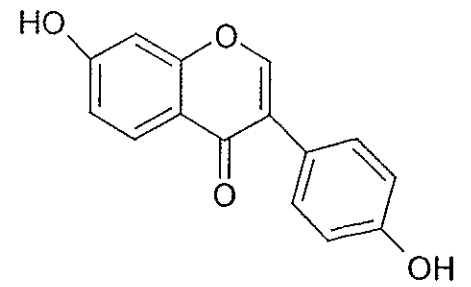
Des exemples de composés à usage clinique et de leurs interactions avec le système endocrinien sont exposés dans le tableau 4

# PHYTO-OESTROGENES

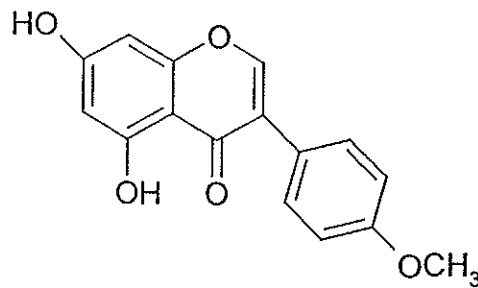
## ISOFLAVONES



Génistéine

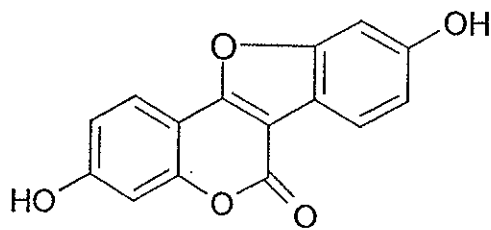


Daïdzéine



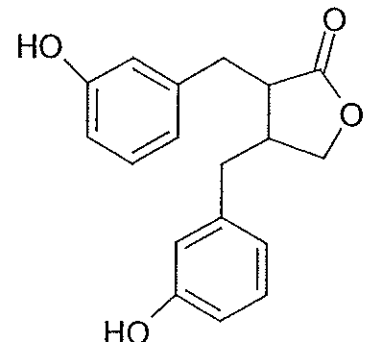
Biochanine-A

## COUMESTANES



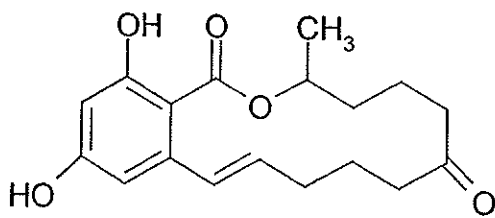
Coumestrol

## LIGNANES

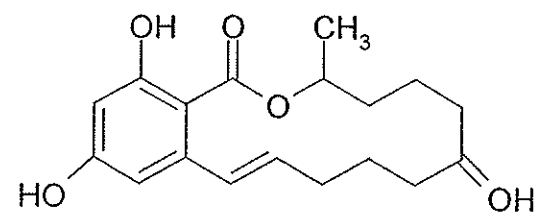


Entérolactone

## MYCO-OESTROGENES



Zéaralénone



Zéaralénol

Figure 4 : Structure chimique de quelques phyto-oestrogènes et myco-oestrogènes.

### 1.3 Les oestrogénomimétiques naturels :

Les phyto-oestrogènes et les myco-oestrogènes sont des composés à activité oestrogénique produits naturellement par les plantes et les champignons. On dénombre plusieurs familles chimiques parmi lesquels les isoflavones, les coumestanes et les lignanes. Les isoflavones sont principalement retrouvées dans les fabacées (soja, trèfle), le coumestrol est particulièrement concentré dans la luzerne, et les lignanes sont présents dans les graines de lin et de sésame (Benneteau-Pelissero *et al.* 1998). Les niveaux de phytoestrogènes peuvent atteindre plusieurs g/kg dans certains végétaux pouvant entrer dans l'alimentation animale et humaine (Mambrini *et al.* 1999). Plusieurs phytoestrogènes pourraient cependant présenter des effets bénéfiques à l'encontre d'affections humaines comme le cancer, les troubles cardiovasculaires ou encore l'ostéoporose (Morton *et al.* 2002).

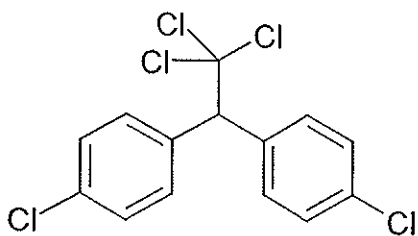
Les myco-oestrogènes sont représentés par deux principaux composés, la zéaralénone et le zéaralénol (métabolite du premier) ; la zéaralénone est produite par des moisissures du type *fusarium* se développant sur les céréales (blé et maïs) et d'autres produits végétaux (Kuiper-Goodman, 1987, Smith *et al.* 1994) à des températures comprises entre 12 et 14°C. Cette mycotoxine est entre autre un contaminant des aliments pour animaux : elle a été reconnue comme responsable de la survenue d'un syndrome oestrogénique chez la truie, entraînant des troubles de la fécondité ainsi qu'une augmentation de la mortalité périnatale.

### 1.4 Les xéno-oestrogènes :

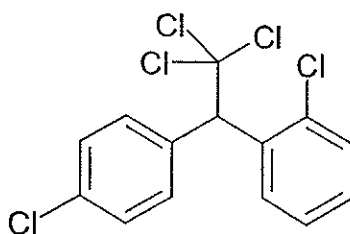
#### 1.4.1 *Les pesticides organo-chlorés :*

Le DDT, que nous avons présenté précédemment est un mélange de plusieurs isomères dont les principaux sont le p,p'-DDT et le o,p'-DDT qui est l'isomère le plus oestrogénique. Leur activité a été démontrée *in vitro* et *in vivo* par de nombreuses études. Ces deux composés possèdent une activité utérotrrophe chez le rat et induisent la prolifération des cellules MCF-7. Chez le poisson, l'activité oestrogénique du DDT a été mise en évidence par son induction de la synthèse de vitellogénine et des protéines de la *zona radiata* (Toppari *et al.* 1996, Tyler *et al.* 1998, Celius et Walther, 1998). Chez les oiseaux, ce composé peut induire une féminisation des embryons mâles (Fry et Toone, 1981), et il est probablement

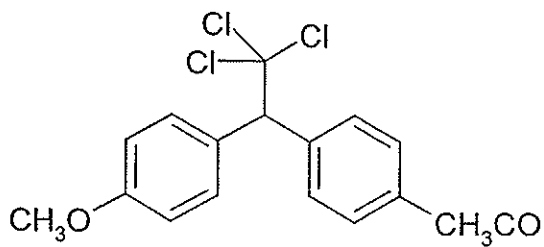




p, p'-DDT



o, p'-DDT



Méthoxychlor

**Figure 5** : Structures chimiques de trois pesticides organochlorés.

responsable d'une altération du développement de l'appareil reproducteur chez les reptiles (Guillette *et al.* 1995, 1994).

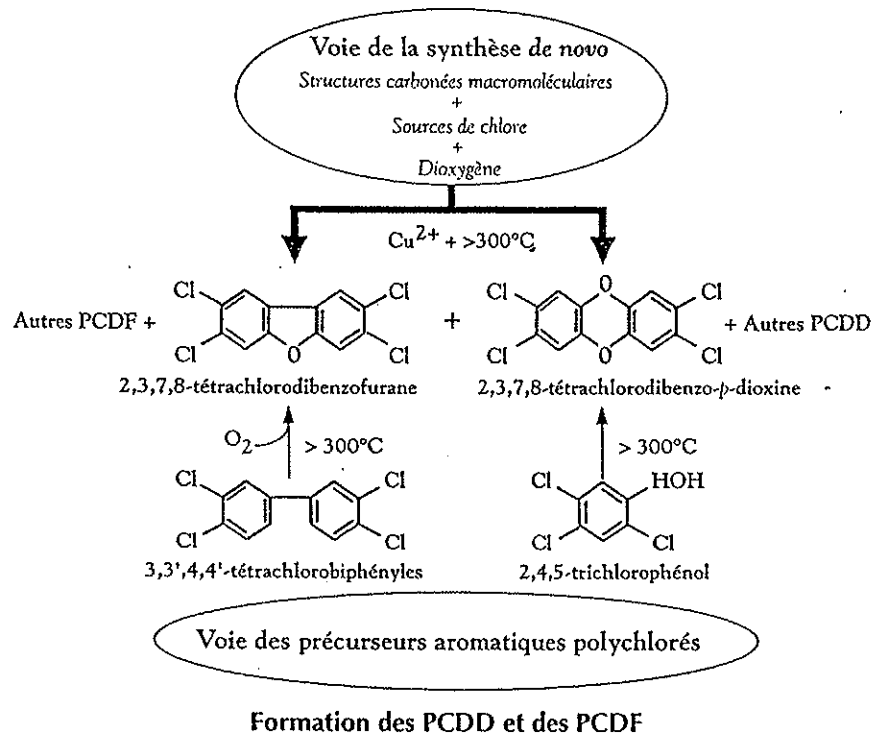
Le méthoxychlor la dieldrine et le lindane sont d'autres pesticides organochlorés qui entraînent des effets similaires à ceux du DDT. Il a été montré les effets délétères du méthoxychlor chez le rat pour lequel une exposition à ce composé pendant la gestation et la lactation réduit la taille des testicules, de l'épididyme et affecte la qualité du sperme. Dans ce cas, les métabolites du méthoxychlor (de structure phénolique et bisphénolique) ont une activité oestrogénomimétique supérieure au composé parent. La dieldrine perturbe la spermatogenèse et la fertilité des rongeurs mâles (Toppari *et al.* 1996) ; le lindane quant à lui, stimule la synthèse de vitellogénine et induit la formation d'un *ovo-testis* chez le poisson mâle (Tyler *et al.* 1998).

Le 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) est un nématocide qui a été utilisé dans les bananeraies. Une étude menée par Whorton *et al.* (1977) a mis en évidence que ce composé entraînait une baisse de la fertilité, une azoospermie ainsi qu'un oligospermie. Le DBCP était aussi responsable d'une augmentation du taux de FSH ainsi que du ratio testostérone/gonadotrophines ; dans ce cas une relation effet-dose a été mise en évidence. Enfin, ce composé aurait aussi été responsable d'une augmentation des avortements spontanés ainsi que d'une modification du sex ratio avec un excès de naissances de filles.

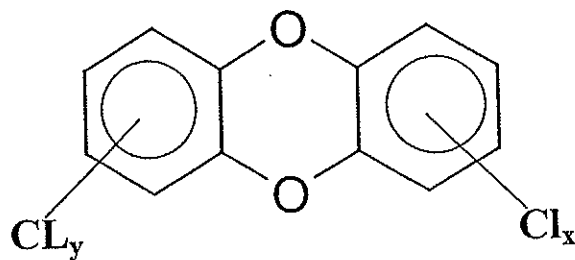
La vinclozoline (un anti-fongique), le chlordécone (képone), le lindane, mais également des carbamates et des organophosphorés ont été étudiés pour leurs propriétés perturbatrices (activité anti-androgénique pour la vinclozoline, oestrogénique pour la chlordécone, modification du sex ratio due au lindane...).

#### 1.4.2 Les polychlorodibenzodioxines et les polychlorodibenzofuranes :

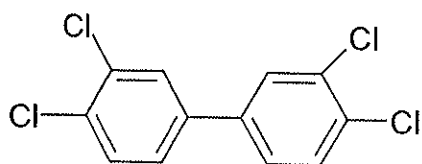
Les polychlorodibenzodioxines et les polychlorodibenzofuranes (PCDD) et (PCDF) sont des produits formés au cours de la plupart des processus de combustion naturels et industriels, particulièrement lorsque de fortes températures sont requises (incinération, métallurgie). Les principales sources de contamination résultent donc de l'incinération des déchets (ils sont alors produits sur les cendres d'incinération lors du refroidissement des fumées), mais aussi de la synthèse de composés aromatiques hydroxylés



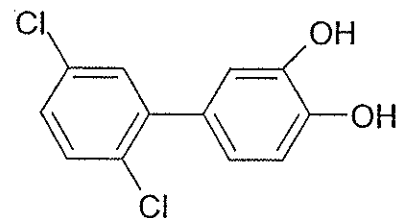
**Figure 6 :** Les deux principales voies de synthèse des PCDDs et des PCDFs.



**Figure 7 :** Structure générale des PCDDs.



3,4,3',4'-tetrachlorobiphényle



2,5-dichloro-3',4'-biphényldiol

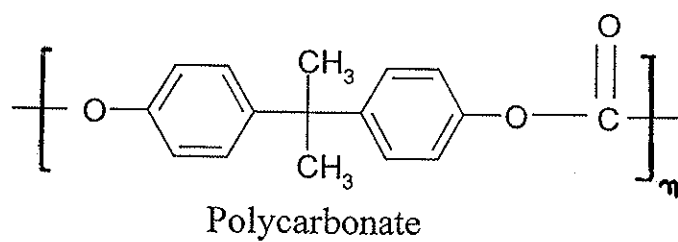
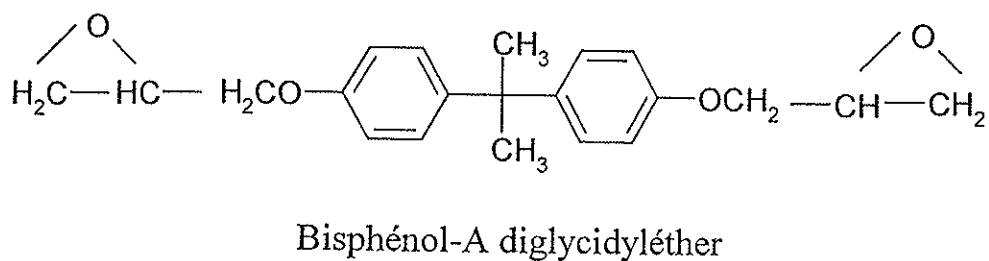
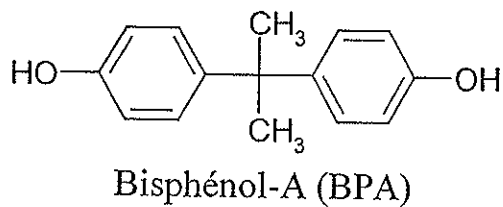
**Figure 8 :** Structures chimiques d'un PCB et d'un PCB hydroxylé.

ou halogénés comme le chlorobenzène et le chlorophénol qui entrent dans la composition d'herbicides (acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique par exemple ; dans ce cas, les PCDD et les PCDF sont présents en tant qu'impuretés dans les herbicides), de bactéricides (hexachlorophène) et d'un produit de traitement du bois, le pentachlorophénol. Le recyclage des matériaux non ferreux faisant intervenir la refonte de matériaux contaminés par des polluants organiques chlorés conduit également à la formation de PCDD et de PCDF. Dans les années soixante, l'émission de ces composés était principalement liée aux activités industrielles impliquant la synthèse de dérivés chlorés comme les PCB, le PVC ou les procédés de fabrication de la pâte à papier (procédés utilisant du dichlore).

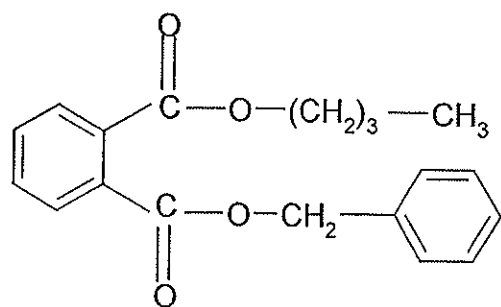
Les PCDD et plus particulièrement la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (2,3,7,8-TCDD) plus connue sous le terme de « dioxine » ou « dioxine de Seveso » sont sortis de l'anonymat après l'accident survenu à l'usine ICMESA à Seveso. Des études menées en laboratoire sur des rongeurs ont montré qu'elle pouvait entraîner de nombreux troubles de la reproduction et du développement : effets négatifs sur les organes reproducteurs, la spermatogenèse, le nombre d'ovules disponibles par maturation folliculaire, diminution de la fertilité de l'activité sexuelle observée chez les femelles de rongeurs. Elle présente en outre des effets immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes.

#### *1.4.3 Les polychlorobiphényles :*

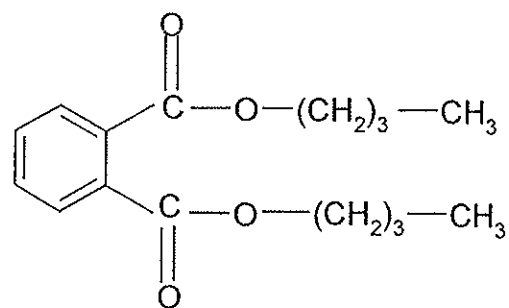
Les polychlorobiphényles (PCB) sont des mélanges de composés aromatiques chlorés synthétisés par chloration du biphényle. On en dénombre plus de 200 dont un peu moins de la moitié contaminent notre environnement (Tyler *et al.* 1998). Ces composés ont été synthétisés industriellement à partir de 1929 pour être utilisés à de nombreuses fins : fluides hydrauliques et diélectriques, adhésifs, cires... Leur utilisation a été interdite en 1977 mais, de par leur forte rémanence, on en retrouve encore une grande partie dans l'environnement. Aux USA en 2000, on estimait que 70% de la production mondiale était encore en utilisation ou en stock et était donc susceptible de contaminer l'environnement. Les effets biologiques des PCB sont complexes et différent quantitativement mais aussi qualitativement en fonction de leur structure : certains congénères présentent une activité oestrogénique, d'autres une activité anti-oestrogénique ; certains métabolites hydroxylés sont quant à eux structurellement proches de la thyroxine et capables d'affecter les niveaux de thyroxine chez le rat (Tyler *et al.* 1998).



**Figure 9 :** Structures chimiques du Bisphénol-A, résines époxy et polycarbonates.



Phtalate de butyle de benzyle (BBP)



Phtalate de dibutyle (DBP)

**Figure 10 :** Structures chimiques des principaux phtalates.

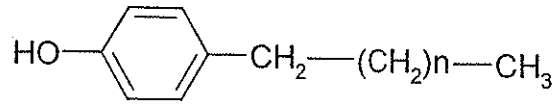
#### 1.4.4 Les résines époxy et les produits dérivés des polycarbonates :

Le bisphénol-A (BPA) est un produit synthétique constitué de deux cycles aromatiques de type phénol, son organisation structurale est proche de celle du DES. La majorité du BPA est utilisée dans la fabrication des polycarbonates (pour 60% de sa production), des résines époxy (à hauteur de 30%) et des résines polyesters (Ben-Jonathan et Steinmetz, 1998). L'utilisation de ces constituants est très large, on les retrouve dans des produits aussi variés que les lentilles optiques, les emballages et récipients pour la nourriture et les boissons, les peintures et les vernis, les matériaux de construction, les amalgames dentaires ou encore les disques compacts. Le BPA est susceptible d'être relargué depuis les vernis recouvrant l'intérieur des emballages ou containers contenant des aliments. Dans les amalgames dentaires où les résines époxy sont largement utilisées (sous forme de polymères de BPA diglycyl méthacrylate), le BPA incomplètement polymérisé peut être relargué sous l'action des hydrolyses enzymatiques et des forces mécaniques ; une étude menée par Olea *et al.* (1996) a décelé la présence de résidus de BPA ou de dérivés dans la salive des patients testés. Par ailleurs des résines époxy sont utilisées afin de fixer les prothèses comme les prothèses de la hanche, aucune étude n'a pour l'instant étudié la dégradation et le possible passage de ces composés dans l'organisme.

#### 1.4.5 Les phtalates :

Les phtalates sont des composés principalement utilisés afin de donner de la souplesse et de l'élasticité aux plastiques. Ils sont employés dans la fabrication du PVC, des emballages plastiques (dont les emballages à usage alimentaire), les isolants électriques, le matériel à usage médical, ainsi que dans la composition de certains cosmétiques (solvants de parfum, sprays fixant) ou encore dans la composition d'huiles lubrifiantes ou d'aérosols répulsifs d'insectes. Ils sont également utilisés dans la fabrication des enveloppes gastro-résistantes de certains médicaments sous forme de gélules. Ce sont des contaminants ubiquitaires de l'environnement aquatique. L'exposition des êtres humains se fait principalement au travers de l'alimentation, mais aussi *via* l'air respiré, chez les travailleurs des industries de plastique ou encore chez les patients au cours de transfusions sanguines (Thibault, 2000).

### AP

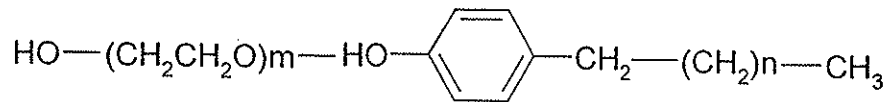


Structure générale des Alkylphénols (AP)

n=6 octylphénol (OP)

n=7 nonylphénol (NP)

### APE



Structure générale des Alkylphénols polyéthoxylés (APE)

m= nombre d'unités éthoxy (m varie de 1 à 100).

**Figure 11 :** Structures chimiques des principaux alkylphénols (AP) et des alkylphénols polyéthoxylés (APE), *para*-substitués.

#### 1.4.6 Les alkylphénols :

Les alkylphénols (AP) sont utilisés pour leurs propriétés assouplissantes et antioxydantes dans la fabrication de certains plastiques comme le PVC ou le polystyrène. Ils sont des précurseurs dans la synthèse des alkylphénols polyéthoxylés (APE), surfactants non ioniques qui entrent dans la composition des détergents industriels et sont également utilisés dans l'industrie du textile et du papier ou encore dans l'industrie du métal et des plastiques (Anonymous, 1997). On les retrouve aussi comme additifs pour les peintures, dans les produits de toilette et les spermicides (Talmage, 1994 ; Sonnenschein et Soto, 1998), dans des formulations de pesticides, des encres, des agents adhésifs et dans la forme galénique de certains médicaments afin d'augmenter leur absorption intestinale (Swenson *et al.* 1994). Les AP et le NP ont été interdits en Europe dans la formulation des détergents à usage ménager dans les années 1970.

Ces composés (et majoritairement le nonylphénol polyéthoxylé, NPEO) présents dans les eaux usées et les effluents industriels sont biodégradés lors du traitement en station d'épuration (STEP). La dégradation par les bactéries de l'environnement et dans les STEP consiste en la coupure de la chaîne hydrophile polyéthoxylée qui conduit à la formation des métabolites finaux que sont les alkylphénols. Du fait de leur caractère lipophile accru et de leur plus grande rémanence, ces alkylphénols (majoritairement du NP) sont retrouvés dans les effluents de ces stations mais surtout dans les boues générées par le traitement des eaux. Des concentrations allant jusqu'à 225 mg/Kg pour des boues d'origine industrielle (Gejlsberg *et al.* 2001). Comme d'autres contaminants organiques de l'environnement (PCB, dioxines, DDT, phtalates...), le nonylphénol possède une activité de perturbateur endocrinien et plus particulièrement une activité oestrogénique, démontrée *in vitro* et *in vivo*.

Les effluents des STEP et ceux d'origine industrielle contaminent le milieu aquatique où les teneurs varient de quelques ppb dans l'eau des rivières à quelques ppm dans les sédiments (Ahel *et al.* 1994). Le recyclage des boues de STEP (épandage dans les champs) ainsi que l'utilisation de formulations pesticides renfermant des APE entraîne une contamination du sol. Les eaux de ruissellement et de lessivage des champs pouvant être une source supplémentaire de contamination du milieu aquatique.





#### 1.4.7 Les métaux :

Les organométalliques (organostanniques) sont des composés métalliques dérivés de l'étain : on retrouve en particulier dans cette catégorie le tributylétain, un composé biocide utilisé dans les peintures anti-corrosion (anti-fouling paints) appliquées sur les coques des bateaux. La large utilisation de ce composé a conduit à la pollution de nombreux sites portuaires ainsi qu'à la contamination d'élevages marins (pisciculture et ostréiculture). L'impact écologique du TBT est devenu évident à la fin des années 1970 lorsque des déformations des coquilles ainsi que des troubles de la reproduction dans des élevages d'huîtres aient été rapportés (Alzieu, 1991). Le TBT est responsable du phénomène d'imposex : le TBT inhibe de manière compétitive l'enzyme aromatase (Cytochrome P450 dépendante) responsable de la transformation de la testostérone en 17- $\beta$ -oestradiol. Il en résulte un accroissement des taux de testostérone chez les organismes femelles et une imposition des caractères mâles chez les femelles (Matthiessen et Gibbs, 1998). L'utilisation de ce composé a provoqué le déclin voire l'extinction de populations locales de mollusques un peu partout dans le monde, y compris en Europe et en mer du nord. L'utilisation de ce composé a été interdite pour les bateaux de plaisance et plus récemment pour les gros tonnages.

#### 1.4.8 Les solvants :

De nombreux solvants sont susceptibles de se comporter comme des perturbateurs endocriniens. Peu d'études portent encore sur leurs effets sur les fonctions de reproduction ; on peut cependant citer quelques composés suspectés : le 2-bromopropane, solvant de l'industrie des fréons pourrait être à l'origine d'anomalies du sperme et d'augmentation des gonadotrophines. Le disulfure de carbone entraînerait une oligoasthénospermie ; des effets sur la reproduction masculine dus à des éthers de glycol ont été observés (ces effets sont le plus souvent réversibles pour des expositions faibles ou courtes). L'exposition au toluène serait liée à une baisse de la testostérone sanguine et des gonadotrophines sériques. Tétrachloroéthylène, styrène, trinitrotoluène et trichloroéthylène seraient eux aussi associés à des troubles des fonctions de la reproduction (Pillière, 2002).

**NB :** Concernant ces solvants, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés et il n'est pas démontré qu'il s'agisse de composés oestrogénomimétiques.

**Tableau 5** : Action des polychlorobiphényles (PCB) sur la thyroïde (d'après Laboureaux-Soares, 2004).

<b>Mécanisme ou cible d'action</b>	<b>Effet observé</b>
<b>Morphologie</b>	Hyperplasie, hypertrophie cellulaires Augmentation de la taille des follicules Modification de la colloïde
<b>Hormones thyroïdiennes</b>	Diminution de la T4
<b>Foetus</b>	Anomalie du développement cérébral (diminution de la T4)
<b>Fonction thyroïdienne</b>	Hypothyroïdie (augmentation du catabolisme des hormones)
<b>Mécanismes auto-immuns</b>	Augmentation des anti-corps (anti-TPO, anti-Tg, anti-récepteur de la TSH)

## **2. Les perturbateurs des autres systèmes hormonaux :**

### **2.1 Les perturbateurs du système thyroïdien (tableaux 5 et 6) :**

Parmi ces composés, on va retrouver un certain nombre de composés cités précédemment : on peut citer tout d'abord les PCB, des anomalies des fonctions thyroïdiennes sont mentionnées chez le dauphin (Laboureau-Soares Barbosa, 2004) et les phoques (respectivement abcès thyroïdien et diminution du taux d'hormones thyroïdiennes ainsi que fibrose interstitielle) ; le tableau ci-contre résume les effets des PCB sur la fonction thyroïdienne. Une étude épidémiologique a mis en évidence une augmentation du volume de la thyroïde et des anticorps anti-peroxydase et anti-thyroglobuline chez des femmes exposées. Une autre étude montre une fréquence accrue des thyroïdites auto-immunes par rapport aux témoins (Pillière, 2002).

Le DDT favorise le développement de goitre et d'hyperplasie cellulaire chez l'oiseau ; des études menées chez l'animal montrent que le DDT et ses métabolites affectent le métabolisme des hormones thyroïdiennes par induction de l'activité enzymatique des microsomes hépatiques.

La dioxine entraîne chez le rat une hypothyroxinémie par augmentation du catabolisme hépatique de la T4 ; ce phénomène serait dû à une augmentation de l'activité des UDP-glucuronyltransférases.

Les phtalates quand à eux présentent une activité indirecte sur le système thyroïdien : leur dégradation par une bactérie gram négatif conduit à la formation d'acide dihydroxybenzoïque (DHBA) qui est un inhibiteur de la thyroperoxydase et qui bloque par conséquent l'incorporation de l'iode aux hormones. Dans ce cas, la cause de la perturbation est complexe et résulte d'une double contamination des eaux par phtalates et par cette bactérie (Laboureau-Soares Barbosa, 2004).

Le mercure et le cobalt seraient associés à des baisses de la T3 libre (liées à une exposition cumulée) ainsi qu'à une augmentation de la T4 libre. Les travailleurs exposés officiaient dans une usine de porcelaine pour le cobalt (utilisation d'un colorant bleu à base de cobalt) et dans l'industrie du chlore pour le mercure.

**Tableau 6 :** Agents environnementaux responsables de goitre ou d'effets anti-thyroïdiens (d'après Laboureau-Soares, 2004).

Composés	Effets anti-thyroïdiens		
	Homme	Animal	<i>in vitro</i>
<b>Sulfurés organiques</b>			
Thiocyanate	+	+	+
Isothiocyanate	NT	+	+
Disulfites	NT	+	
Goitrine	+	+	+
<b>Flavonoïdes</b>			
Phénol	NT	NT	+
Cathécol	NT	NT	+
Hydroquinone	NT	NT	+
Phloroglucinol	NT	+	+
2,4-dinitrophénol	+	+	0
<b>Pyridines</b>			
Diisobutylphtalate	NT	NT	0
Diocetylphthalate	NT	+	0
Acide-o-phtalique	NT	NT	0
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	NT	NT	+
<b>Polychloro et polybromobiphényles</b>			
PCB	NT	+	NT
PBB	+	+	NT
<b>Autres organochlorés</b>			
p,p'-DDT	NT	+	NT
TCDD	NT	+	NT
<b>HAP</b>			
3,4-benzopyrène	NT	+	NT
3-méthylcholanthrène	NT	+	NT
9-méthylanthracène	NT	+	0
<b>Composés inorganiques</b>			
excès d'iode	+	+	+
lithium	+	+	+

NT : Composé non testé

+: Effet positif

0 : Pas d'effet observé

D'autres composés entraînent des troubles thyroïdiens : les sulfurés organiques (thiocyanates, isothiocyanates, thio-oxazolidinones), molécules retrouvées chez les crucifères, mais aussi pour les thiocyanates dans les effluents industriels et l'organisme des individus tabagiques. On peut encore citer le 2-mercaptobenzimidazole, puissant anti-oxydant utilisé dans l'industrie ou encore les disulfites, composés majeurs de l'ail et de l'oignon ou même certains flavonoïdes.

## 2.2 Perturbateurs endocriniens des autres systèmes : synthèse des stéroïdes, métabolisme des stéroïdes, système nerveux central :

Les perturbateurs endocriniens peuvent avoir d'autres cibles que celles citées précédemment, cependant les outils manquent encore pour évaluer ou élucider l'action et les cibles de tels composés. La majorité des outils d'analyse existant étant pour l'instant dévolue à l'étude des fonctions de reproduction et aux effets oestrogénomimétiques. On peut cependant citer quelques composés susceptibles d'agir sur d'autres cibles, notamment sur le cortex surrénalien.

Le plomb par exemple : si aucun lien de cause à effet n'a encore été définitivement mis en évidence, treize études réalisées chez des salariés exposés professionnellement ont conclu à l'existence d'une corrélation entre l'exposition à ce métal et des anomalies des fonctions de la reproduction masculine, avec une baisse du taux de testostérone ainsi qu'une augmentation de la LH et de la FSH. Par ailleurs, une plombémie élevée (400 µg/l) semble être liée à une baisse de la fertilité ainsi qu'à des anomalies de la qualité du sperme (Pillière, 2002) ; dans ce dernier cas cependant, l'atteinte des spermatozoïdes pourrait être due à des mécanismes de toxicité directe. Ce métal pourrait enfin être lié à une augmentation du taux des catécholamines plasmatiques et des valeurs de la tension artérielle.

Le cadmium : une récente étude réalisée Piasek *et al.* (2002) a montré que le cadmium pouvait avoir une activité de perturbateur endocrinien. L'étude a montré que ce métal affectait la production ovarienne de progestérone et de testostérone *in vitro* chez le rat et interférait *in vivo* avec la stéroïdogénèse chez le rat femelle. Les auteurs



montré que ce métal affectait la production ovarienne de progestérone et de testostérone *in vitro* chez le rat et interférait *in vivo* avec la stéroïdogénèse chez le rat femelle. Les auteurs concluent que ce métal pourrait altérer le déroulement de la gestation ainsi que la viabilité du fœtus.

Le mercure (Pillière, 2002) : chez des salariés de l'industrie du chlore exposés au mercure inorganique, plusieurs études ont trouvé une corrélation entre le taux de mercure et une baisse du taux de testostérone totale sérique ; aucun effet sur la fertilité n'a été mis en évidence.

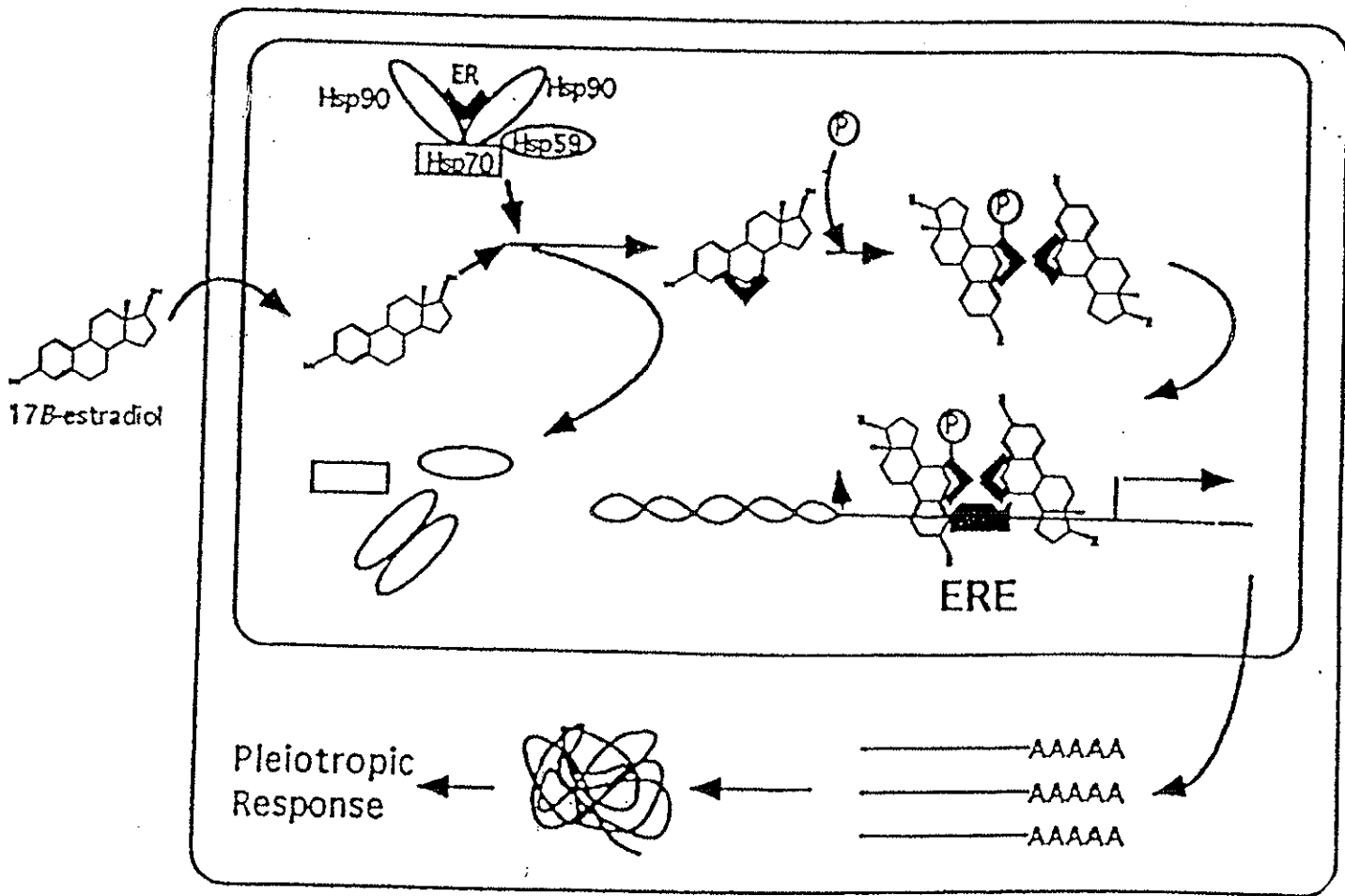
Des solvants comme le disulfure de carbone entraîneraient dans le cadre d'une exposition chronique une baisse de l'excrétion de l'adrénaline urinaire et de la dopamine plasmatique ; une baisse de l'activité dopamine  $\beta$ -hydroxylase serait associée à une exposition au toluène (Pillière, 2002). Le BPA semble avoir des effets sur le cerveau chez l'individu en développement avec des effets directs sur le SNC avec des atteintes hypothalamiques, limbiques ou du *locus coeruleus* (Markey *et al.* 2003).

La liste de composés n'est pas exhaustive et il n'est pas exclu que des molécules connues pour leur activité oestrogénomimétique possèdent une action sur d'autres composantes du système endocrinien ; la mise au point de nouveaux outils d'analyse pourrait permettre d'évaluer un plus grand nombre de cibles potentielles des perturbateurs endocriniens.

### **III. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens :**

Les cibles des perturbateurs endocriniens sont diverses, néanmoins la majorité des mécanismes d'action décrits concernent l'activité des oestrogénomimétiques. Ce paragraphe va donc s'attacher à présenter ces différents mécanismes (directs et indirects). D'autres mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens intervenant au niveau des régulations cellulaires tels que le niveau d'expression des récepteurs, la transduction des signaux intracellulaires existent mais ne seront pas développés ici.





**Figure 12 :** Schéma d'activation du récepteur aux oestrogènes (RE) par liaison de son ligand (17-β-oestradiol), suivie de la transcription de la séquence ERE de l'ADN correspondant à « l'élément de réponse aux oestrogènes » après fixation du complexe récepteur-ligand (tiré de Gillesby et Zcharewski, 1998).

**NB :** La dose, le poids corporel, le moment et la durée d'exposition à certaines périodes critiques de la vie sont des aspects essentiels de l'activité des perturbateurs endocriniens. Les effets engendrés peuvent être réversibles ou non, immédiats ou retardés sur une période plus ou moins longue. Ces différentes notions que sont l'existence de fenêtres d'exposition et la notion dose-effet seront développées dans d'autres paragraphes.

## **1. Mécanismes d'action directe des oestrogénomimétiques :**

### *1.1 Activation directe d'un récepteur:*

Les oestrogènes sont des hormones stéroïdiennes synthétisées et sécrétées par les follicules ovariens entourant les ovocytes. Le 17- $\beta$ -oestradiol (E2) est le principal oestrogène rencontré chez les vertébrés, il agit en se fixant au niveau d'un récepteur nucléaire aux oestrogènes (RE). La liaison de l'E2 au RE entraîne l'activation du récepteur puis déclenche un signal de transduction qui aboutit à la transcription d'un gène cible codant pour la synthèse d'une protéine oestrogéno-dépendante (figure 12). Les xéno-oestrogènes environnementaux possèdent des affinités pour le RE qui sont toutefois plus faible que celle de l'E2 (de 500 à 5000 fois plus faibles). Il semblerait qu'il existe une étroite corrélation entre l'affinité de liaison au RE et la réponse biologique des composés.

Un premier mécanisme d'action de ces composés réside donc dans leur interaction directe avec le RE. A titre d'exemple, White *et al.* (1994) ont montré que les AP interagissaient avec le RE dans une région similaire au domaine de liaison de l'E2. Il est à noter l'existence de plusieurs types de RE (RE $\alpha$  et RE $\beta$ ) chez les organismes vivants, dont l'expression varie en fonction de l'organe considéré et pour lesquels l'E2 et les autres oestrogénomimétiques présentent des affinités différentes ; ainsi le 4-NP et l'o,p'-DDT présentent une affinité plus importante pour le RE testiculaire que pour le RE hépatique (Loomis et Thomas, 1999). La liaison des xéno-oestrogènes au RE peut donc affecter l'expression des gènes cibles du RE ; par exemple le NP induit le récepteur à la progestérone dans les cellules MCF-7 (Soto *et al.* 1991) et peut également induire dans ces cellules l'expression des gènes pS2, MUC1 et du RE (Ren *et al.* 1997).



Selon ce même schéma des perturbateurs peuvent agir par l'intermédiaire d'autres récepteurs : l'activité anti-androgénique de la vinclozoline, un antifongique utilisé pour protéger les cultures de fruits et légumes, résulte de l'activité de ses métabolites pour le récepteur aux androgènes : ces métabolites agissent comme des antagonistes des hormones androgènes.

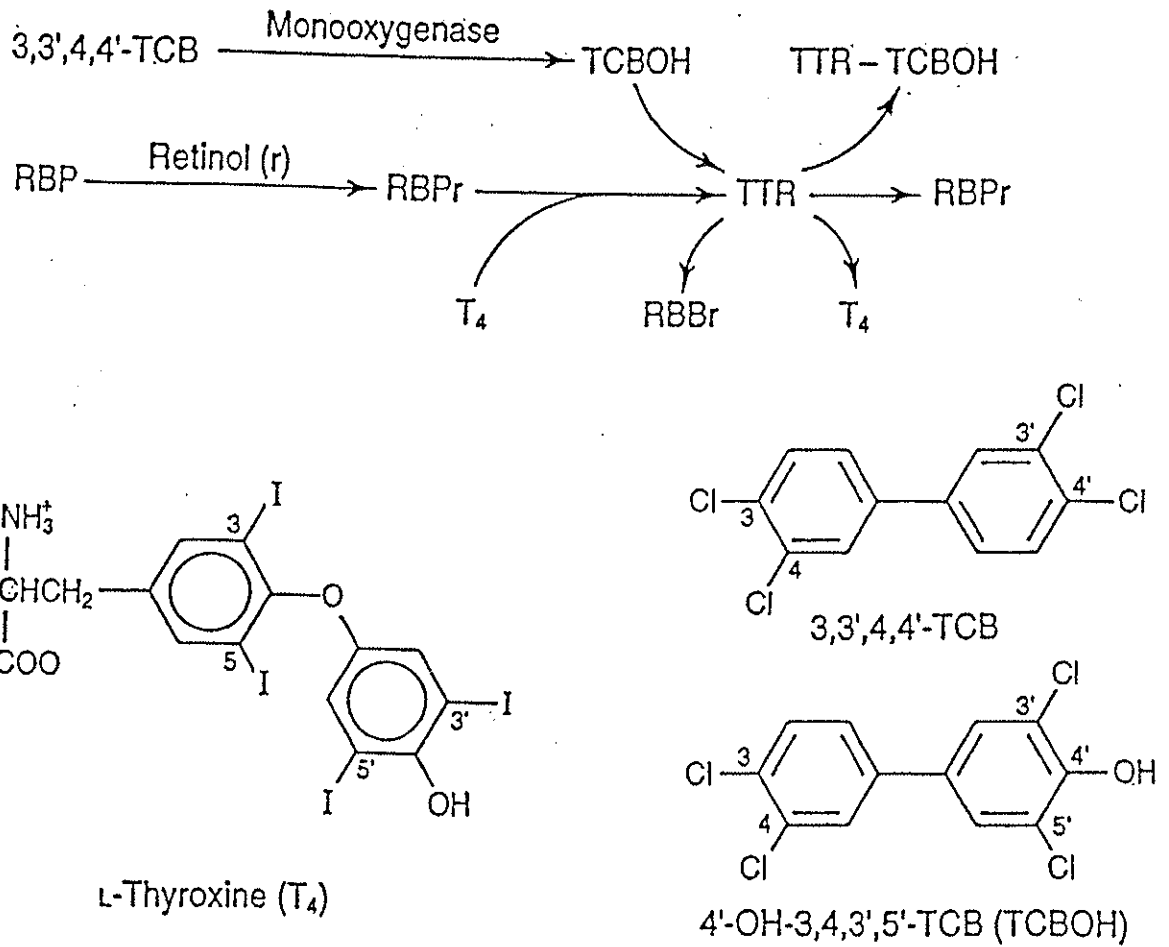
### *1.2 Blocage de la fixation du ligand à son récepteur :*

A l'inverse, d'autres composés peuvent agir en empêchant la fixation d'un composé endogène sur son récepteur ; ainsi l'o,p'-DDT et la chlordécone peuvent inhiber la liaison des ligands endogènes aux récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone. D'autres composés tels que le NP et un métabolite du méthoxychlor ont la capacité d'inhiber la liaison des ligands naturels aux récepteurs à la progestérone, aux androgènes et au RE. Il est probable que les xéno-oestrogènes soient aussi susceptibles d'interférer avec la régulation post-transcriptionnelle des gènes cibles des oestrogènes.

## **2. Mécanismes d'action indirecte des oestrogénomimétiques :**

### *2.1 Altération de la synthèse des oestrogènes :*

Le cholestérol est un composé précurseur dans la synthèse des oestrogènes. Une molécule capable d'altérer sa synthèse ou sa biodisponibilité est susceptible de modifier la formation des oestrogènes mais aussi des androgènes et de la progestérone (Meikle *et al.* 1996) ; les inhibiteurs et inducteurs de l'activité des enzymes de la biosynthèse des oestrogènes sont également capables d'interférer avec la synthèse des oestrogènes. Le finastéride possède un mode d'action de ce type (blocage de la 5- $\alpha$ -réductase), le fénarimol est un fongicide qui est capable d'inhiber la synthèse de l'aromatase et donc de l'oestradiol (Hirsch *et al.* 1987).



**Figure 13 :** Mécanisme d'action des PCBs : compétition pour la protéine de transport (transthyréine, TTR) entre le PCB hydroxylé et la thyroxine ( $\text{T}_4$ ). La  $\text{T}_4$  qui n'est plus liée est alors rapidement glycoconjuguée, ce qui entraîne son élimination et la chute des taux plasmatiques de  $\text{T}_4$ , préjudiciable pour le fœtus (d'après Brouwer *et al.* 1990).

## 2.2 Modification du transport des oestrogènes :

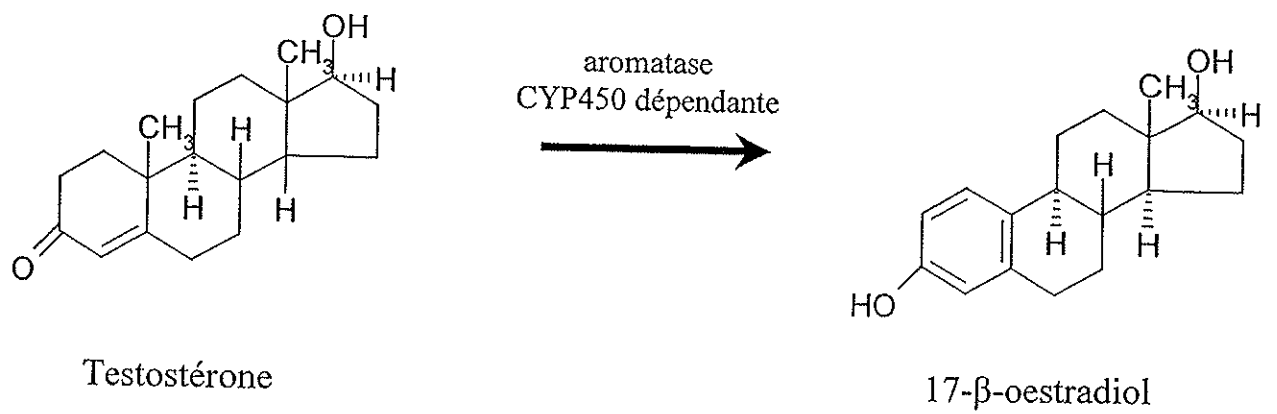
Après leur synthèse, les hormones sexuelles sont libérées et transportées dans le sang vers les organes cibles sous forme libre ou liée à des protéines plasmatiques spécifiques ou non. Une modification du transport plasmatique des hormones naturelles est un mode de perturbation envisagé, les xéno-oestrogènes pourraient agir par compétition avec l'E2 pour ses sites de fixations sur les protéines de transport. La SHBG est une protéine spécifique du transport des oestrogènes, certains phyto-oestrogènes induisent la production de cette protéine, mais du fait de leur plus forte affinité pour celle-ci, limitent sa disponibilité pour les oestrogènes (Havsteen, 1983). Certains composés comme les PCB, peuvent interférer avec la fixation des hormones (Tyler *et al.* 1998), notamment la thyroxine, sur leurs protéines de transport, (qui est dans cette étude la trans-thyréthine ; étude menée chez le rat) ce mécanisme est décrit par la figure 13.

## 2.3 Altération du métabolisme des oestrogènes :

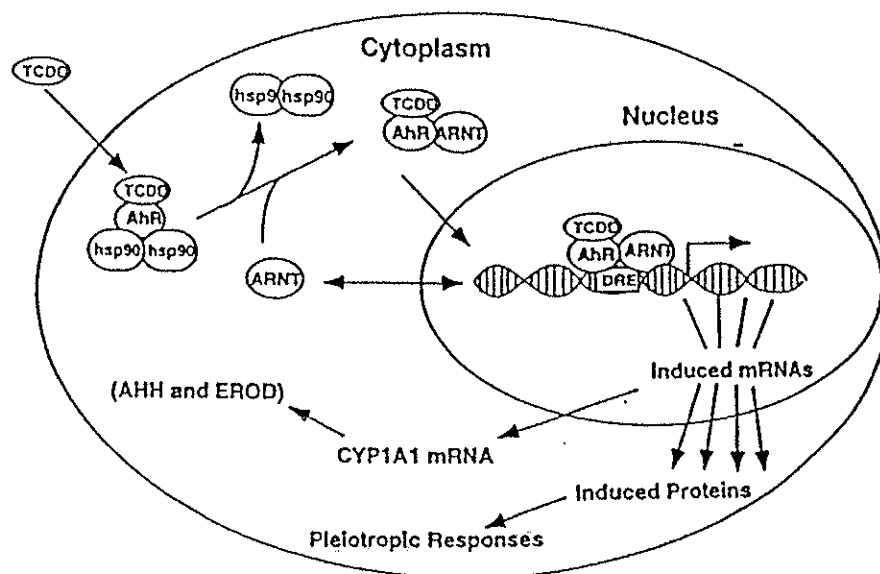
La 2,3,7,8-TCDD est capable d'induire le cytochrome P450 1A1 qui entre en jeu dans l'hydroxylation et le métabolisme des oestrogènes, cette induction se fait par l'intermédiaire du récepteur Ah. (figure 15). Thibault *et al.* (2001) ont suggéré que le NP et l'octylphénol pouvaient interférer avec le métabolisme des stéroïdes par inhibition des cytochromes P450 impliqués dans la biotransformation de ces hormones. Le TBT quant à lui, est capable d'interférer dans la conversion des androgènes en oestrogènes par blocage de l'enzyme aromatasase qui assure cette transformation (figure 14).

## 2.4 Atteinte des mécanismes de rétrocontrôle :

Les taux intracellulaires des récepteurs aux oestrogènes sont déterminants dans la sensibilité des cellules aux oestrogènes et aux antioestrogènes. L'exposition des cellules aux oestrogènes est suivie d'une régulation négative des sites de liaison à ces hormones, ce qui permet un contrôle de leur activité. Une action par perturbation de ces phénomènes de régulation et de rétrocontrôle est donc envisageable : dans le cas des hormones sexuelles, la synthèse est régulée par d'autres hormones comme la LH et la FSH elles-mêmes sous le contrôle de la GnRH sécrétée par l'hypothalamus ; une atteinte de ce système est donc susceptible d'altérer la production des hormones de l'axe hypothalamo-



**Figure 14 :** Mécanisme d'action du TBT responsable d'un phénomène de masculinisation (imposex). Le TBT entraîne l'inhibition compétitive de l'enzyme aromatase responsable de la conversion de la testostérone en oestradiol (d'après Matthiessen et Gibbs, 1998).



**Figure 15 :** Schéma de l'activation du récepteur nucléaire Ah par la TCDD qui conduit à l'expression de gènes codant pour le CYP 1A1, 1A2, l'aldéhyde déshydrogénase, la glutathion transférase...

hypophysaire et d'entraîner des effets négatifs. Le coumestrol a été décrit comme un inhibiteur possible de la sécrétion de FSH par l'hypophyse.

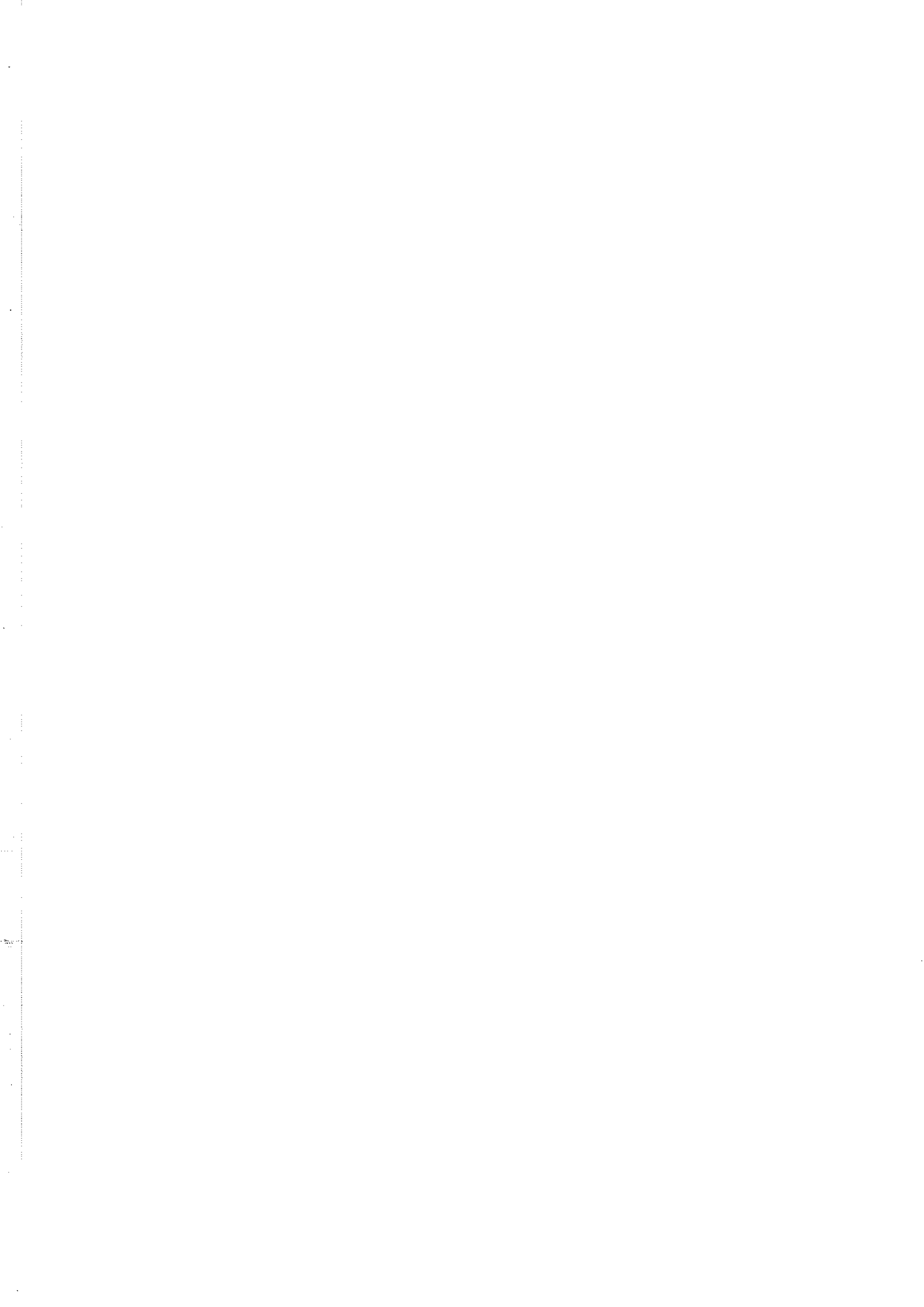
### *2.5 Activation indépendante de la fixation du ligand :*

Un autre mode d'action enfin, pourrait être celui de l'activation du récepteur indépendante de la fixation de son ligand : si le mécanisme classique de l'activation d'un récepteur passe par sa liaison avec un ligand, des modèles cellulaires ont mis en évidence la possibilité d'une activation indépendante de ce dernier (Weigel et Zhang, 1998). Ce phénomène, qui a été montré pour des facteurs de croissance endogènes (IGF-1, EGF et TGF $\alpha$ ) n'est pas exclue dans le cas des perturbateurs endocriniens.

Il existe d'autres mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens intervenant au niveau des régulations cellulaires tels que le niveau d'expression des récepteurs ou la transduction des signaux intracellulaires. Par ailleurs, un même composé peut agir selon des modes d'action différents en fonction de la dose considérée : c'est le cas du tamoxifène et du torémifène pour lesquels on parle de ratio oestrogénique/anti-oestrogénique ; une étude (Tyler *et al.* 1998) concernant les PCB a montré que leur activité peut aussi différer de manière qualitative : certains des PCB montrent une activité oestrogénique tandis que d'autres témoignent d'une puissante activité antagoniste du récepteur aux oestrogènes.

En conclusion nous voyons ici qu'il existe une multitude de schémas d'action possibles, dont certains ne sont qu'à l'état d'hypothèse. Au final, le mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens reste mal défini et pour l'instant centré sur les oestrogénomimétiques ; il existe peut être autant de mécanismes que de composés et parfois même des mécanismes multiples pour un seul composé. La mise en place de nouveaux outils analytiques et éventuellement une approche plus globale de la problématique permettront d'élucider de nouveaux mécanismes d'action.





#### IV. Relation structure-activité chez les perturbateurs endocriniens :

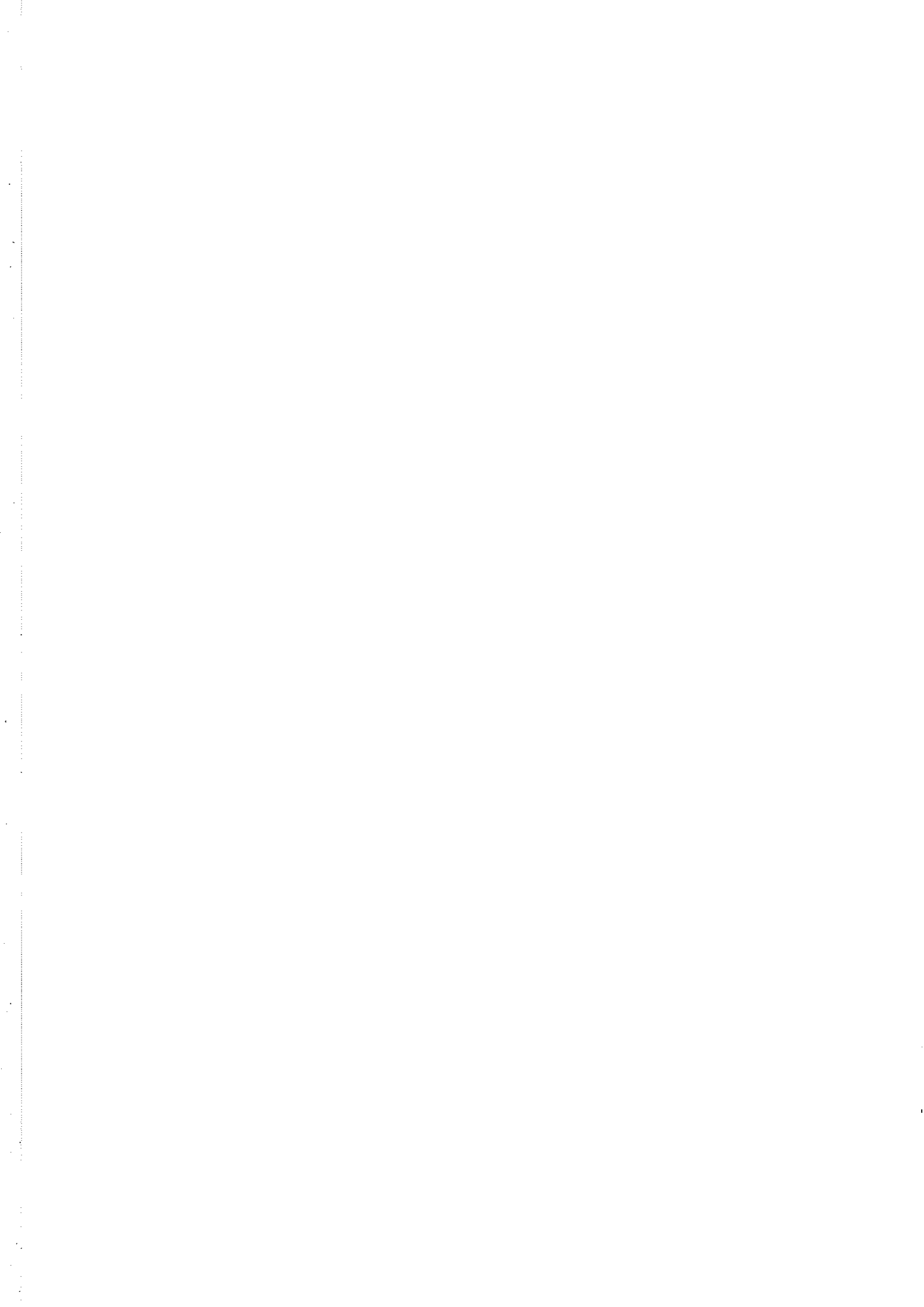
Il est d'usage en toxicologie de rechercher une relation entre l'activité d'un composé toxique et sa structure, ce qui permet bien souvent d'élucider son mécanisme d'action. Peut-on appliquer ce même type de relation dans le cas des perturbateurs endocriniens, pour lesquels on retrouve déjà des mécanismes d'action très complexes ?

Dans le cas des oestrogénomimétiques, un cycle aromatique de configuration plane est la structure centrale retrouvée dans la majorité des composés possédant une activité oestrogénique. La dégradation du cycle aromatique conduit souvent à une perte de cette activité. Mais il existe aussi des composés doués d'activité oestrogénique qui ne présentent pas dans leur structure ce cycle aromatique.

La nature et la place des substituants jouent également un rôle important dans l'activité des composés oestrogéniques. Dans le cas des phyto-oestrogènes, la position exacte ainsi que le nombre de substituants hydroxy semblent déterminer le potentiel d'une molécule à se lier au récepteur RE. A titre d'exemple, l'isoflavone de type génistéine possède une affinité avec le récepteur RE $\beta$ , alors que les congénères présentant un substituant hydroxy en moins (daïdzéine et biochanine A) ou deux substituants en moins (cas de la formononétine) présentent une affinité nettement inférieure pour ce même récepteur (Tham, 2002).

Dans le cas des PCB, l'activité oestrogénomimétique semble être inversement proportionnelle à leur degré de chloration, les congénères les moins chlorés (Arochlor 1221, 1232, 1242 et 1248) possèdent l'activité la plus élevée (Toppari *et al.* 1996) ; là aussi, l'hydroxylation semble affecter le potentiel oestrogénique des PCB (Andersen *et al.* 1999).

Dans le cas des PCDD, la position des groupements chlorés influe de manière semblable sur le potentiel oestrogénique : la présence de quatre de ces groupements en position 2,3,7,8 ; comme dans le cas de la dioxine de Seveso est un facteur de toxicité (la 2,3,7,8-TCDD est le congénère le plus cancérigène de la famille). Au-delà de ce degré de chloration, on observe une diminution de l'activité des composés, probablement liée à des problèmes d'encombrement stérique.



Le BPA est un composé constitué de deux cycles phénoliques et renfermant deux groupements hydroxy en position *para* (ce qui lui confère une structure très proche de celle du DES). Les résultats d'études portant sur plusieurs composés structurellement proches dont le tétrabromobisphénol A (TBBPA) (Samuelsen *et al.* 2001), montrent que si le BPA, le MBBPA, le DBBPA, le tri-BBPA et le TBBPA induisent une prolifération cellulaire, la capacité à induire cette prolifération diminue lorsque le nombre d'atomes de brome augmente sur le composé. Le TBBPA serait donc le composé le moins oestrogénique. Par ailleurs, Meerts *et al.* (2000) a montré que le TBBPA est capable de se lier *in vitro* à la transthyréine humaine, protéine de transport des hormones thyroïdiennes. Par analogie avec les PCB, ils pensent que la présence d'un groupement hydroxy en *para* avec un ou deux atomes d'halogène sur les positions adjacentes est essentiel pour la liaison de ce composé à cette protéine.

Kitamura *et al.* (2002) ont étudié l'activité thyroïdienne du TBBPA et du tetrachlorobisphénol A. Ils ont montré que ces deux composés interagissaient avec les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et ont rappelé qu'ils pouvaient être transportés par la transthyréine *in vitro*. Ces deux composés, qui possèdent une similitude structurale avec les hormones thyroïdiennes, ont une activité thyroïdienne alors que le bisphénol A ne possède pas ce type d'activité. La présence des atomes d'halogènes semble donc indispensable.

Le TBBPA possède une activité antagoniste vis-à-vis de la transduction du signal initiée par l'hormone thyroïdienne T3 en se liant à son récepteur (Sakai *et al.* 2003) tandis que le Tribromophénol et le 2,6-dibromophénol ne possèdent pas cette activité.

Concernant le nonylphénol, qui est en fait un mélange constitué de nombreux isomères de position et de ramification de la chaîne alkyle, les isomères de position en *para* présentent une activité oestrogénique supérieure que les autres. Routledge et Sumpter (1997) ont rapporté que l'activité oestrogénique des AP était dépendante de la taille et des ramifications de la chaîne alkyle ; Soto *et al.* (1992) ont décrit des conditions structurales nécessaires pour qu'un AP puisse exercer une activité oestrogénique : la présence d'au moins trois atomes de carbone sur la chaîne alkyle et un squelette carboné formé uniquement de liaisons C-C, l'introduction d'une liaison C-O détruisant l'activité oestrogénique.

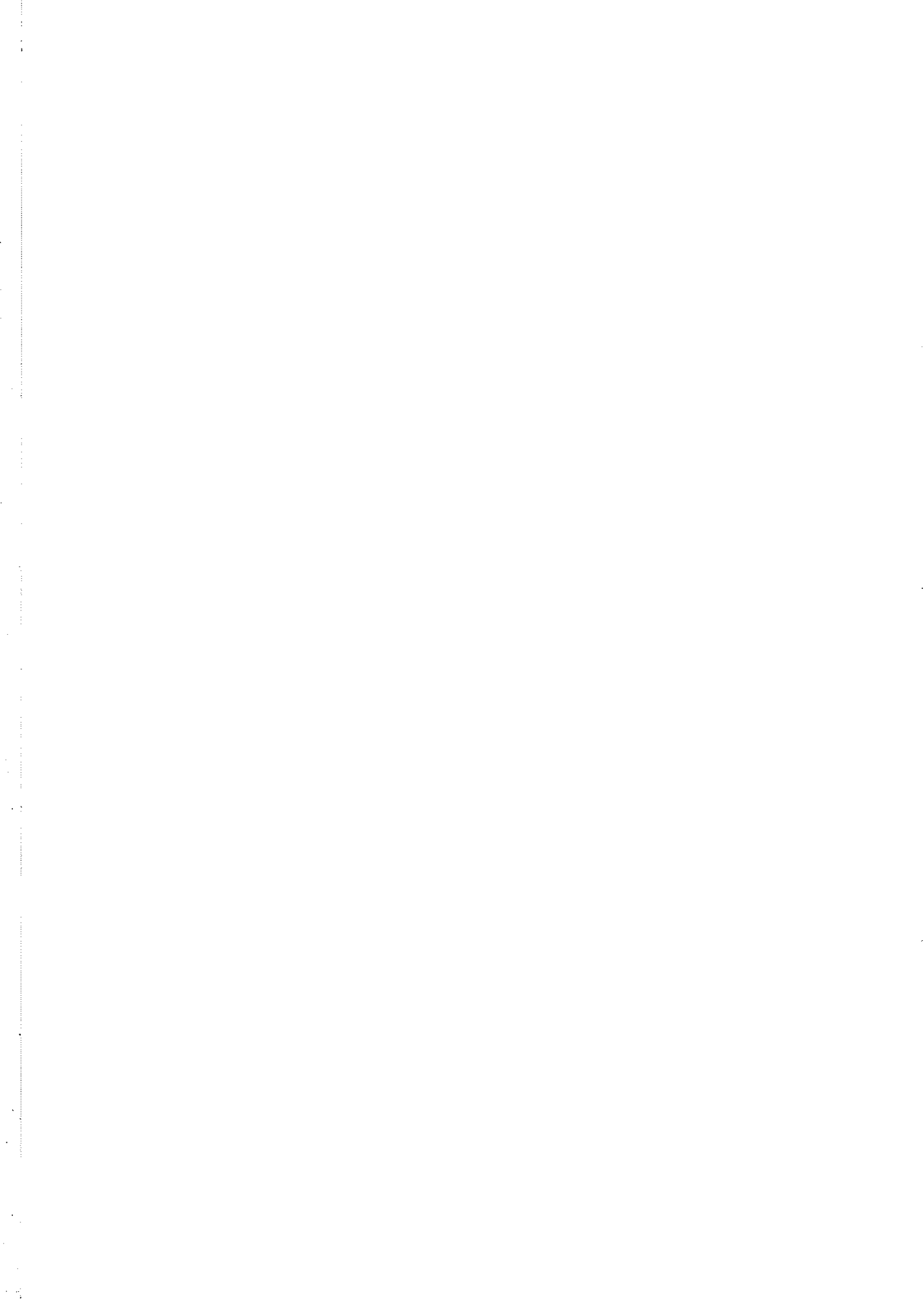
**Tableau 7 :** Exemples d'atteinte des fonctions de la reproduction humaine associées à l'exposition à des perturbateurs endocriniens, en fonction des composés et de la période d'exposition (d'après Damgaard, 2002).

Période d'exposition	Atteintes observées	Sources d'exposition
<b>Enfants</b>	Diminution du ratio mâle/femelle Malformations congénitales Perturbations du développement Cryptorchidie Hypospadias Baisse de la qualité du sperme Développement prématuré de la poitrine Puberté précoce	Dioxines, pesticides Herbicides PCB, PCDF Pesticides (DDT, HCB...) Phyto-oestrogènes, pesticides PCB, PCDF Phtalates p,p'-DDE
<b>Femmes adultes</b>	Irrégularités menstruelles Diminution de la fertilité et de la fécondité Endométriose Cancer de l'utérus Augmentation des avortements spontanés	PCB, PCDF PCB Dioxine, PCB Pesticides Hexachlorobenzène (HCB)
<b>Hommes adultes</b>	Baisse de la qualité du sperme Diminution de la fertilité Cancer des testicules Gynécomastie Hypertrophie et/ou cancer de la prostate	PCB, éthylparathion, styrène Pesticides, chloroforme Pesticides, xéno-oestrogènes Oestrogènes synthétiques Pesticides

En conclusion, on peut dire que s'il existe effectivement une relation structure-activité pour les perturbateurs endocriniens, celle-ci est éminemment complexe et varie non seulement en fonction du composé mais aussi pour un même composé en fonction de la cible de ce dernier. Ainsi si la présence d'au moins un cycle aromatique paraît nécessaire à l'activité oestrogénique d'un composé en (terme d'analogie structurale), il existe pourtant de nombreux contre-exemples (chlordécone, cadmium...) et ce point reste controversé. Il semblerait que la présence de radicaux hydroxy module ce potentiel oestrogénique. Cependant avec l'exemple du TBBPA nous voyons que la présence de certains radicaux ou atomes (ici des atomes d'halogènes) si elle entraîne une diminution de toxicité envers une cible particulière peut au contraire augmenter l'affinité du composé pour une autre cible. En terme de relation structure-activité, nous sommes donc dans une situation bien plus complexe que dans le cas de toxiques « classiques » ayant une cible organique ou métabolique. Il convient donc de rester excessivement prudent lorsqu'une relation entre la structure et l'activité d'un composé perturbateur endocrinien est suspectée.

## **V. Influence de l'âge et des phases du développement sur l'effet de l'exposition aux perturbateurs endocriniens :**

Les effets néfastes des perturbateurs endocriniens varient en intensité et en gravité en fonction de l'âge auquel un organisme est exposé à ces contaminants (tableau 5). Il existerait donc des « fenêtres critiques » d'exposition aux perturbateurs endocriniens qui correspondraient à certaines phases du développement. Ces fenêtres varient à la fois en fonction de l'âge de l'organisme et en fonction de l'organe cible étudié : un organe en développement, donc soumis à une régulation hormonale, sera plus sensible à l'activité d'agents hormonaux endogènes ou exogènes, agents susceptibles d'interférer avec son développement. A titre d'exemple on peut citer les observations suivantes : chez les filles des mères enceintes lors de leur exposition au DES, seules celles ayant été exposées *in utero* avant la 13<sup>ème</sup> semaine de gestation ont développé des adénocarcinomes du vagin. Une étude réalisée par Del Rio-Gomez en 2002 a montré une forte diminution du nombre de fils chez les pères exposés à des PCB avant (mais non après) l'âge de 19 ans au moment de l'exposition (incident de Yu-Cheng, des travailleurs et leurs familles ont été exposés à des PCB *via* du riz



contaminé, entre 1968 et 1982). La 2,3,7,8-TCDD quant à elle présente une activité oestrogénique chez l'organisme juvénile mais une activité anti-oestrogénique chez l'adulte.

La période prénatale semble être une des principales phase critique de l'exposition : une exposition *in utero* à des agents toxiques est susceptible de compromettre la différenciation et le développement du fœtus (Damgaard *et al.* 2002). Ce stade de vie foetale est une période critique chez les mammifères au cours de laquelle l'organisme en gestation est très vulnérable vis-à-vis d'une perturbation des fonctions endocrines. Les modalités de l'exposition *in utero* dépendent de la barrière placentaire, mais aussi de la barrière hémato-encéphalique qui n'est entièrement développée qu'à l'âge de 1 an. Le foetus peut donc être exposé indirectement à des composés exogènes par l'intermédiaire de sa mère. Les PCB par exemples sont susceptibles de provoquer chez le fœtus une baisse du taux d'hormones thyroïdiennes, qui se traduira par une altération du développement cérébral et par une atteinte des capacités intellectuelles chez le nouveau-né (Crisp *et al.* 1998). Des anomalies telles que la cryptorchidie et l'hypospadias tirent d'ailleurs leur origine d'un processus se déroulant pendant la vie foetale.

Comparés aux adultes, les enfants sont donc beaucoup plus vulnérables vis-à-vis des toxiques parce qu'ils sont en plein développement ; la puberté représente une autre période critique de l'exposition à des agents exogènes. La différenciation sexuelle est dépendante de l'action des hormones de la reproduction et plus particulièrement de celle des androgènes, (leur présence est indispensable pour le développement des mâles et leur absence l'est pour le développement des femelles). Un déséquilibre de ce rapport androgènes/oestrogènes peut perturber cette différenciation. Certains toxiques environnementaux peuvent perturber cette balance chez le fœtus (Toppari *et al.* 1998). Le développement sexuel masculin normal dépend en outre d'une cascade d'évènements initiés au stade foetal et qui continuent pendant l'enfance et jusqu'à l'adolescence.

En conclusion, les données expérimentales suggèrent que le stade *in utero* est une phase particulièrement critique. L'activité hormonale est très intense pendant le stade foetal, les premiers mois après la naissance et la puberté. Ces périodes sont par conséquent les plus à risque dans le développement du système reproducteur (Tyler *et al.* 1998).





## VI. Peut-on parler d'une relation effet-dose pour les perturbateurs endocriniens ?

Les études classiques de toxicologie consistent pour un produit concerné à déterminer pour différentes doses l'effet observé afin de rechercher une relation effet-dose et de déterminer la plus petite dose n'entraînant aucun effet (NOAEL). Ce principe est basé sur l'hypothèse suivante : tout composé possède une dose seuil en dessous de laquelle on n'observe pas d'effet toxique. La même hypothèse est-elle applicable aux perturbateurs endocriniens ?

Dans le cas des perturbateurs endocriniens, la relation effet-dose est plus délicate à déterminer : dans ce cas, les composés toxiques n'agissent plus simplement sur un organe cible mais sur des hormones physiologiques qui régulent l'homéostasie d'un organisme entier et qui sont elles-mêmes régulées par un système complexe d'interdépendance et de rétrocontrôle positif ou négatif. Dans ce cas, même de faibles doses d'agent perturbateur peuvent entraîner des effets néfastes qui peuvent se répercuter sur l'ensemble du système endocrine et de l'organisme. Si l'on s'en tient à l'hypothèse classique d'une relation effet-dose, il faudrait *a priori* chez l'individu adulte des doses plus élevées que chez l'individu juvénile de tels composés pour entraîner une perturbation identique ou similaire des fonctions endocrines. Or les différentes études montrent que non seulement il est possible qu'une exposition à de faibles doses de composé suffise pour en observer les effets délétères chez l'adulte, mais en plus, que ces effets peuvent varier en fonction du stade de développement de l'individu (action oestrogénomimétique inverse de la TCDD chez l'enfant ou l'adulte).

Par ailleurs, si l'exposition a lieu à une période où l'organisme est plus vulnérable comme nous l'avons vu plus haut, de plus faibles doses d'agent perturbateur sont nécessaires. L'exemple le plus explicite est celui du DES : comme nous l'avons vu, l'administration de faibles doses de DES pendant la grossesse, à une période critique du développement du fœtus, a engendré outre les troubles observés chez les mères, des effets néfastes sur la progéniture (Tyler *et al.* 1998).

Par ailleurs, la liaison (ou la non liaison) des composés aux protéines plasmatiques va moduler l'activité et donc la toxicité des perturbateurs endocriniens : certains composés ayant

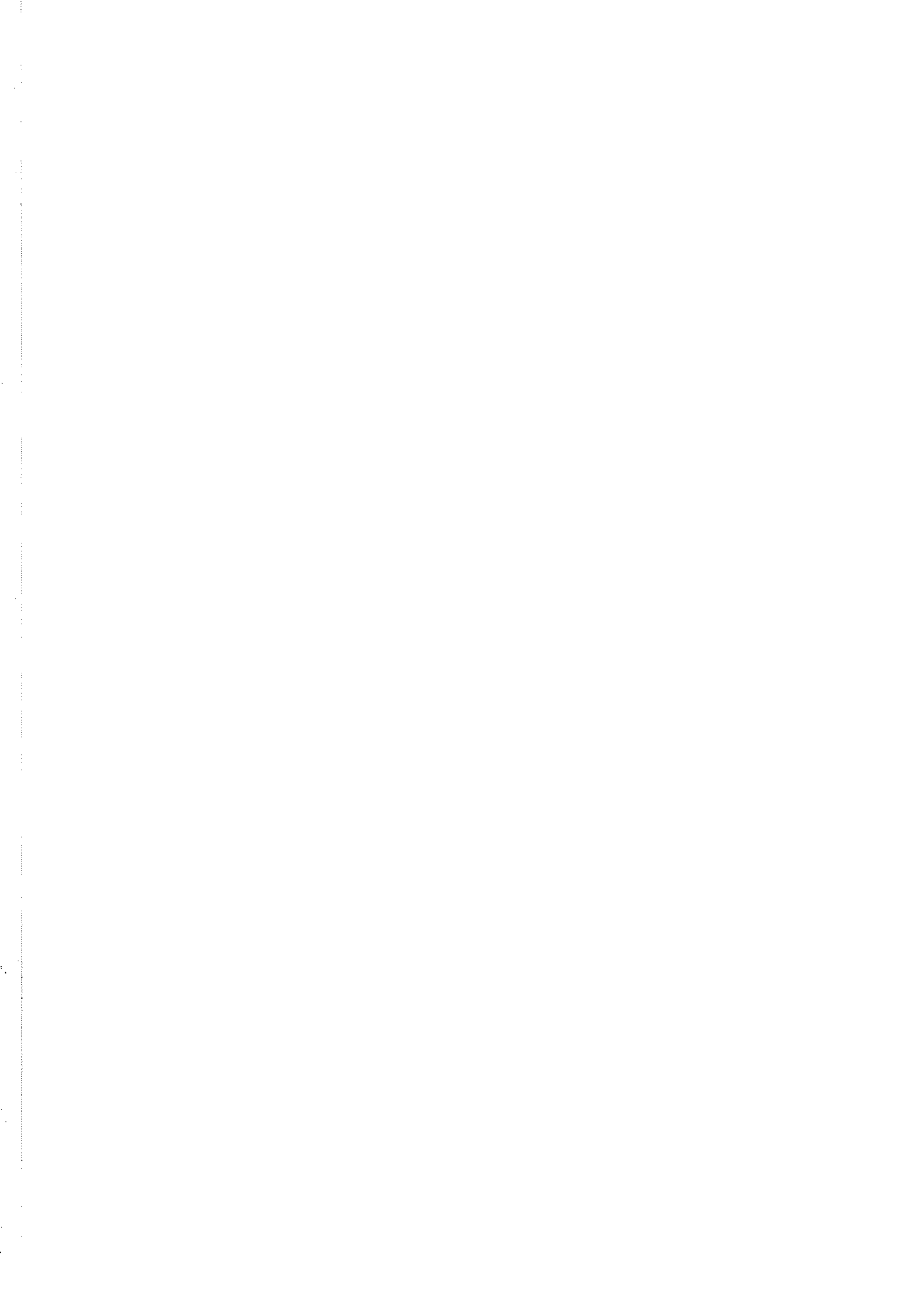


une activité oestrogénique intrinsèque sont actifs à des doses plus faibles que l'oestradiol endogène : ces derniers ne sont pas nécessairement liés à la SHBG, protéine qui transporte normalement 95% de l'oestradiol circulant ce qui le rend donc moins disponible (Toppari *et al.* 1998).

Un autre paramètre est à prendre en compte : en toxicologie « classique », il est d'usage d'observer des relations effet-dose linéaires. Une augmentation de la concentration de toxique administré entraîne naturellement une majoration des effets délétères sur l'organisme. Une étude portant sur la TCDD a fait état d'une corrélation entre des expositions à des doses croissantes de TCDD et le développement d'endométriase chez le singe rhésus (Rize *et al.* 1993) ; cette étude semble donc confirmer l'existence d'une relation effet-dose classique.

Pendant longtemps, c'est ce schéma qui a été appliqué aux perturbateurs endocriniens et l'on a donc recherché les effets engendrés par de faibles concentrations de ces composés ; or il apparaît de plus en plus évident que la courbe effet-dose n'est pas linéaire mais curviligne, en forme de U inversé, avec une intensité des effets similaire pour de faibles et de fortes concentrations et surtout un maximum d'intensité pour des concentrations « critiques » (Swan et Vom Saal, 2002). Les mécanismes qui pourraient expliquer une telle allure de la courbe ne sont pas encore connus, néanmoins des explications sont avancées : la diminution du nombre de récepteurs en présence de fortes concentrations de ligand pourrait en partie expliquer ce phénomène ; cette autorégulation est un phénomène physiologique, par exemple dans le cas des récepteurs utérins à l'oestradiol. Une autre hypothèse suggère la stimulation de systèmes de rétrocontrôle négatif ou de réponse antagoniste qui seraient activés lors de la saturation des récepteurs des hormones physiologiques.

Une autre hypothèse concernant la relation effet-dose est avancée par Soto (2003) : selon cette hypothèse, les composés perturbateurs endocriniens auraient une activité à des doses très faibles (« low-dose effect »), pouvant être supérieure à celles observées pour des doses importantes. Ce phénomène est observé de manière courante dans le cas des hormones sexuelles stéroïdiennes. La courbe effet-dose a donc l'allure d'une parabole, comme dans le cas précédent, mais cette fois, elle aurait la forme d'un U : l'exemple du BPA administré à doses croissantes à des souris pré-pubères confirme cette théorie : les effets oestrogénomimétiques sont observés avec de plus grandes intensités pour les plus faibles et les plus fortes doses administrées, comparativement aux doses moyennes. Le mécanisme

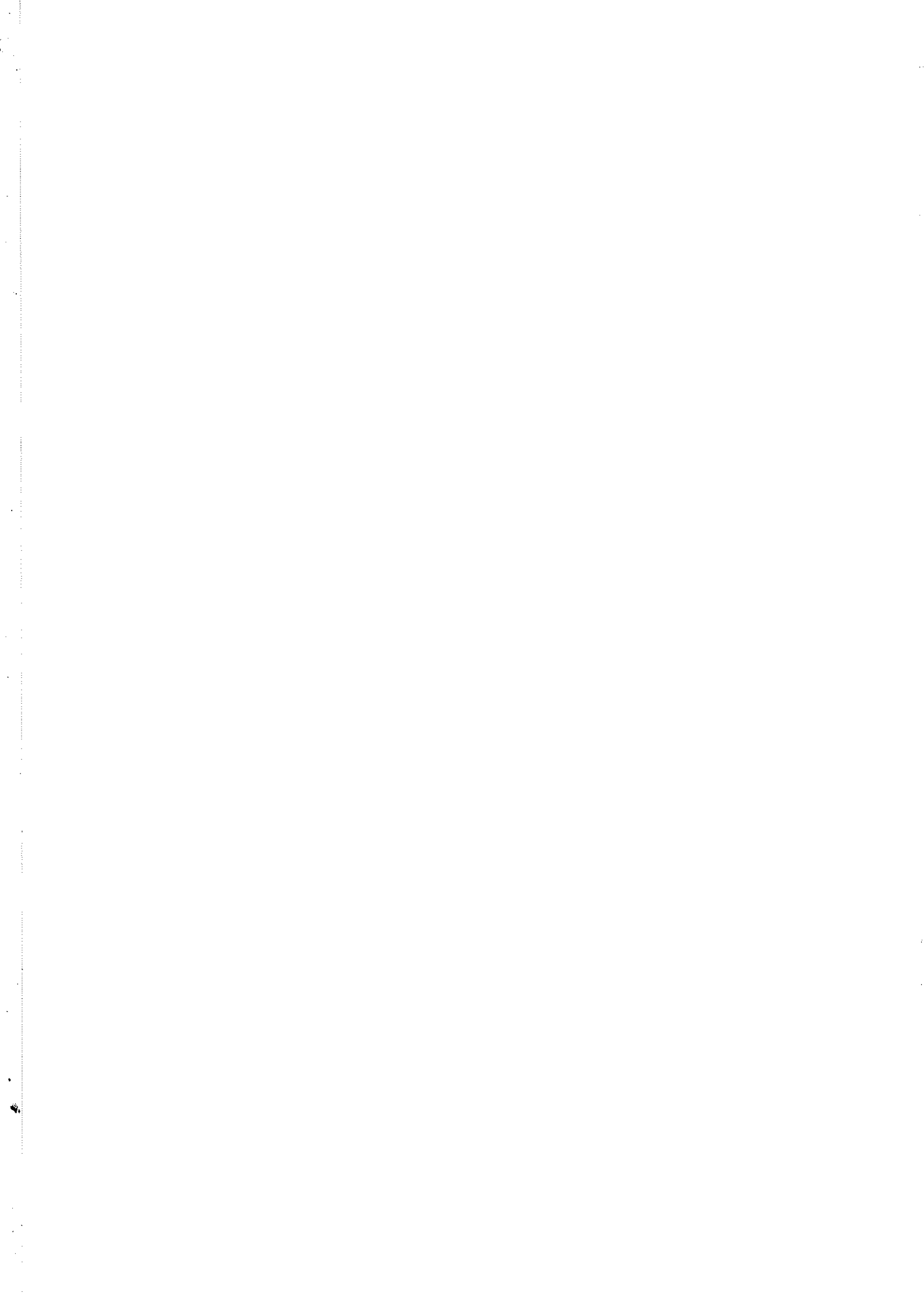


d'action n'est pas encore clairement défini mais il pourrait être lié à l'absence de mécanismes de régulation des récepteurs par leur ligand naturel. Dans ce cas, l'existence et la validité d'un NOAEL pour ces composés semblent compromises.

Enfin, il faut faire preuve d'une extrême prudence lorsqu'on essaye de déterminer une relation effet-dose pour un composé : certains composés oestrogéniques ou oestrogénomimétiques présentent des effets opposés lorsqu'ils sont administrés à faible ou à forte dose. Par exemple dans le cas du développement de la prostate chez la souris (Gupta, 2000), l'administration de faibles doses de DES entraîne un léger accroissement de son développement alors que des doses plus élevées diminuent significativement le poids de cet organe. Il ne faut pas oublier non plus que les perturbateurs endocriniens sont des composés susceptibles d'agir de manière additive entre eux ou avec les hormones endogènes, par exemple des composés tel que le BPA, affectant au premier abord des activités oestrogéniques très faibles sont susceptibles de provoquer un déplacement de la courbe dose-réponse de l'oestradiol vers la gauche. Ces composés sont donc susceptibles d'agir à de très faibles doses, *a priori* insignifiantes, lorsqu'ils sont mis en relation avec des concentrations significatives (en fait les concentrations physiologiques) d'hormones endogènes.

Enfin, il faut également considérer que chez l'homme plus que chez l'animal, il existe des facteurs concomitants susceptibles d'influer sur la gravité des effets produits indépendamment de la dose. Ces facteurs sont le tabac, les maladies préexistantes, l'hérédité, l'âge ou encore l'alimentation (Damstra *et al.* 2002).

En conclusion, il existe de nombreux paramètres à prendre en compte lorsqu'on étudie les perturbateurs endocriniens. La compréhension de leur mécanisme d'action est indispensable mais il faut également prendre en compte la notion de fenêtres d'exposition pouvant modifier l'intensité et le type d'effet produit. Au vu des récentes études, il paraît évident (au moins dans le cas des oestrogénomimétiques) que les effets liés à de fortes concentrations d'oestrogènes naturels ou synthétiques ne peuvent être utilisés pour prédire les effets potentiels à de plus faibles doses. Enfin, il est important de prendre en compte que de faibles doses peuvent se révéler toxiques ; même si une relation effet-dose n'a pu clairement être déterminée jusqu'à présent, il semble avéré qu'une telle relation n'est pas de type linéaire, ce qui remet en cause l'existence de NOAEL ou de doses d'exposition non dommageables pour l'organisme. L'aphorisme de Paracelse semble ne pas trouver d'écho



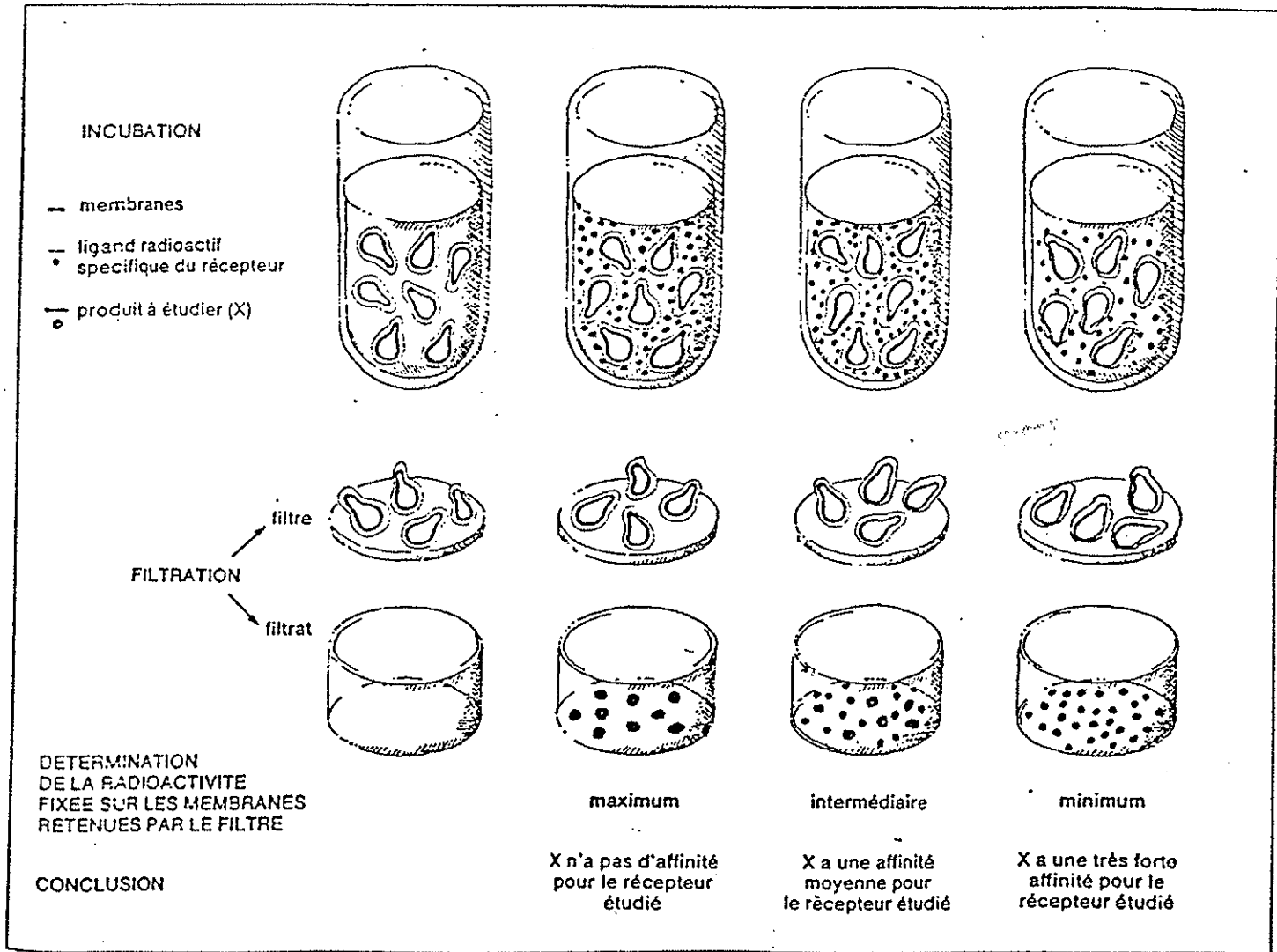
auprès des perturbateurs endocriniens, car s'il est toujours vrai dans ce cas que la dose fait le poison, il semble malheureusement difficile voire impossible de déterminer une dose de référence qui puisse servir de base dans les études de toxicologie et d'écotoxicologie : les variations individuelles, les effets pouvant s'inverser en fonction de la dose d'exposition, l'existence de plusieurs cibles à ces composés, l'existence de fenêtres critiques d'exposition rend toute conclusion définitive à prendre avec prudence, en tout cas avec beaucoup de précautions.

## **VII. Méthodes tests de l'activité hormonale des composés suspects d'être des perturbateurs endocriniens :**

Les études toxicologiques classiques consistant à évaluer les  $DL_{50}$ , la NOAEL ou bien des effets à longs termes (téatogenèse, cancérogenèse) apparaissent insuffisants pour déterminer la toxicité potentielle de composés pouvant perturber le fonctionnement du système endocrinien. S'agissant le plus souvent de polluants environnementaux, la première préoccupation est de déterminer chez l'homme et chez les animaux le niveau d'exposition. En parallèle, il est indispensable de préciser l'activité biologique des composés suspects au moyen de tests d'activité hormonale. La principale difficulté de la mise en place de tels tests provient en partie de la complexité des modes d'action de ces contaminants : un composé peut perdre ou gagner son activité après sa métabolisation *in vivo*, cette même métabolisation peut transformer le produit parental en un composé ayant une activité hormonale différente ou en composé plus actif que le composé parental. Par ailleurs, il n'est pas exclu qu'un même composé puisse avoir plusieurs mécanismes d'action différents et/ou plusieurs cibles différentes.

Les principaux tests existant permettent d'évaluer l'activité oestrogénique du composé étudié ; peu de tests concernant les autres types d'activité ont pour l'instant été développés, nous nous limiteront donc dans ce paragraphe à la revue des méthodes destinées à déterminer le potentiel oestrogénique d'un composé.





**Figure 16 :** Schéma représentatif du test de liaison directe sur un récepteur (La recherche, 1980).

## **1. Tests *in vitro* :**

Les tests *in vitro* sont indispensables afin d'identifier les composés perturbateurs du système endocrinien et afin d'élucider leurs mécanismes d'action. Ces tests sont sensibles, spécifiques et plus économiques que les tests *in vivo*. Ce genre de test est de plus en plus utilisé en routine dans l'industrie afin de tester les possibles effets hormonaux des nouvelles substances. Par ailleurs, des recherches sont menées afin de développer de nouvelles batteries de tests qui remplaceraient les études *in vivo* aujourd'hui encore indispensables.

Ces tests présentent cependant plusieurs inconvénients : tout d'abord, tous ne prennent pas en compte la biotransformation des composés dont certains ne présentent une activité hormonale qu'après avoir été métabolisés dans l'organisme. Cet inconvénient peut être surmonté en incubant le composé à tester avec des fractions microsomales de foie contenant des enzymes type cytochrome P450, enzymes impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques (Boobis *et al.* 1998). Enfin les tests *in vitro* ne peuvent renseigner sur l'évaluation du risque associé au composé testé et ne reflètent que pauvrement la complexité des interactions et des mécanismes d'action retrouvés chez l'homme ou l'animal : la répartition de l'hormone entre les protéines plasmatiques, les autres constituants du sang, l'eau plasmatique et le récepteur cellulaire conditionne l'activité oestrogénique potentielle. A titre d'exemple, on peut citer Welshon *et al.* (1997) et Nagel *et al.* (1998) qui ont montré que la présence du sérum affecte de façon significative la fixation et l'activité des composés oestrogéniques tels que le coumestrol, la génistéine, le bisphénol et l'octylphénol.

### **1.1 Test de liaison directe sur le récepteur oestrogénique :**

Le test de liaison compétitive avec l'oestradiol ou test de liaison directe sur le récepteur aux oestrogènes est utilisé afin de déterminer si l'activité oestrogénomimétique d'un composé est liée à l'interaction avec le récepteur aux oestrogènes (RE). *In vivo*, un xéno-oestrogène va, pour exercer son action, entrer en compétition avec les hormones physiologiques pour la fixation sur le RE (Picard, 2000). On va donc mesurer la capacité du composé testé à déplacer le ligand naturel (oestradiol). Le test de liaison



compétitive mesure la relation entre une concentration unique de ligand radio-marqué en présence de différentes concentrations de ligand compétitif non marqué (Gaido *et al.* 2001). Le pourcentage de liaison spécifique de l'oestradiol radio-marqué sur le récepteur est ensuite déterminé en fonction de la concentration en composé agoniste compétiteur pour le RE (figure 16).

Ce test permet également d'évaluer les interactions directes entre le récepteur et un xénobiotique. Pour cela, on incube des extraits cytosoliques renfermant le récepteur avec des concentrations croissantes en xénobiotique radio-marqué. La liaison spécifique du xénobiotique sur le récepteur est vérifiée par une incubation en présence d'oestradiol froid qui se fixera sur ses sites spécifiques. Le ligand radio-marqué fixé sur son récepteur est séparé du ligand non lié le plus souvent par filtration puis quantifié par comptage en scintillation liquide.

Ce test a été utilisé pour évaluer l'activité oestrogénique des analogues bromés du Bisphénol A sur des cellules humaines de cancer du sein (Samuelson *et al.* 2001). Ceci a permis de montrer que la capacité du TBBPA et de ses analogues à se lier au récepteur aux oestrogènes diffère selon le nombre d'atomes de brome présents sur la molécule : le TBBPA présente la plus faible affinité, cette affinité augmentant lorsque le nombre d'atomes de brome diminue.

Ces essais présentent l'avantage de pouvoir être pratiqués sur des tissus différents, des espèces différentes, mais ne permettent pas de distinguer un composé agoniste d'un antagoniste. Ils peuvent être à l'origine de faux négatifs pour les composés nécessitant une bioactivation ou de faux positifs pour ceux qui sont hautement fixés aux protéines plasmatiques (Jobling *et al.* 1998). Enfin, seule est évaluée ici la liaison au RE, aucune indication n'est fournie sur l'activité oestrogénique.

## 1.2 Test E-screen, test de prolifération cellulaire :

Le test de prolifération cellulaire sur lignée de cellules de tumeur du sein MCF-7 est l'exemple le plus connu de ce type d'essai. Les cellules MCF-7 sont une lignée cellulaire épithéliale issue à l'origine d'une effusion pleurale d'une patiente âgée de 69



ans atteinte d'un cancer du sein en phase de généralisation. La maladie répondant à une thérapie hormonale, cette lignée de cellules de glandes mammaires a servi à la mise au point de ce test par Soto et Sonnenschein en 1985. La prolifération des cellules est dépendante de la présence des oestrogènes (Gaido *et al.* 2001). Le test E-screen évalue le nombre de cellules MCF-7 présentes au bout de 6 jours d'incubation dans un milieu supplémenté en sérum et dépourvu d'oestrogènes, en présence ou en absence d'un xéno-oestrogène suspecté.

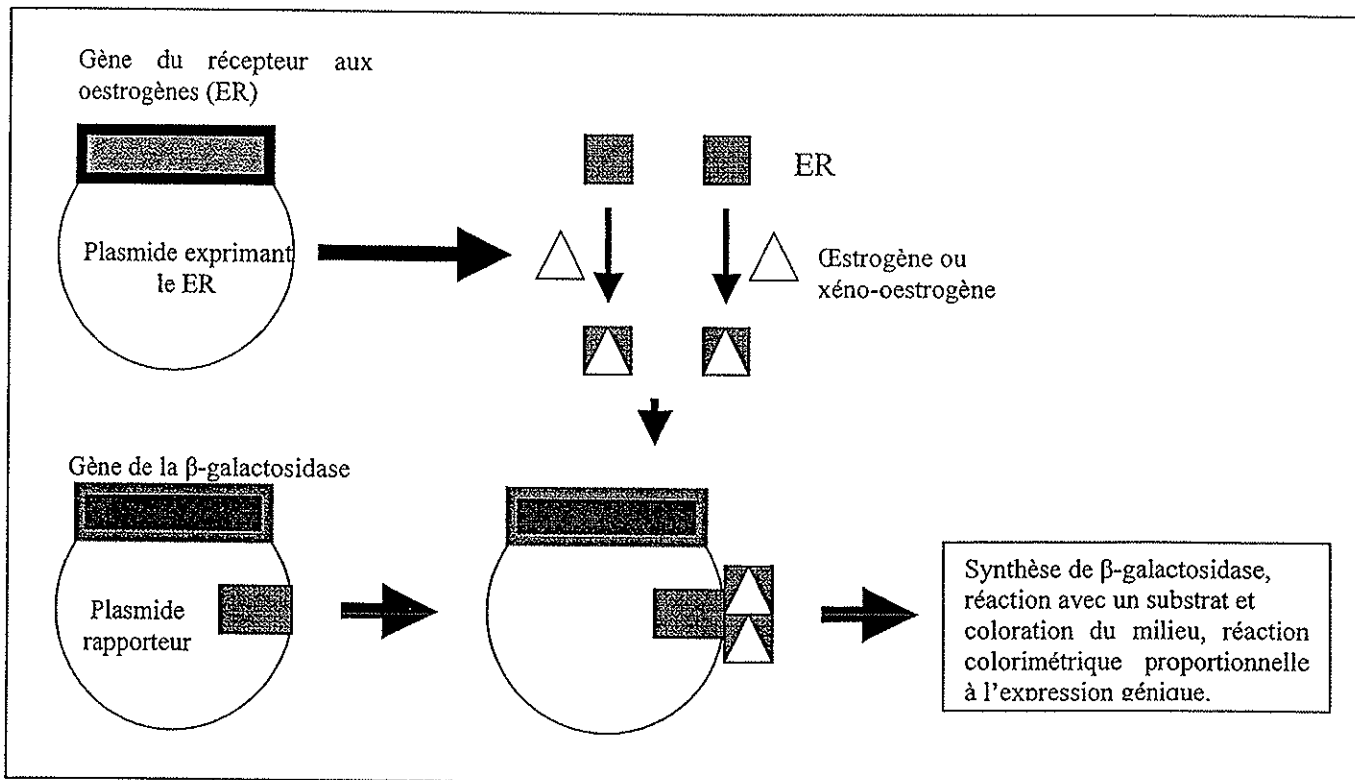
Un composé est considéré comme un agoniste du récepteur aux oestrogènes lorsqu'il induit une augmentation significative de la prolifération cellulaire par rapport au composé contrôle positif (l'oestradiol); inversement, une substance est dite antagoniste lorsqu'elle inhibe la prolifération cellulaire quand elle est ajoutée dans le milieu de culture en même temps qu'une dose inductrice d'oestradiol.

Le test E-screen sur les cellules MCF-7 est l'un des tests les plus sensibles utilisé pour évaluer l'activité oestrogénique d'un xénobiotique (agoniste et antagoniste peuvent dans ce cas être détectés) mais il nécessite des conditions de cultures bien définies et n'est pas automatisable contrairement à d'autres essais. De plus, les conditions de culture des cellules (composition du sérum, présence de substances mitogènes comme l'IGF, clones cellulaires) peuvent entraîner des variations de résultats intra et inter laboratoires parfois importantes (Zacharewski *et al.* 1997). Enfin, ce test reste très difficile à mettre en place lorsqu'il s'agit de tester des mélanges de composés suspects.

La lignée MDA-MB231 dépourvue en ER et insensible aux oestrogènes est parfois utilisée comme contrôle négatif de la réponse aux oestrogènes. En effet une absence de réponse dans ces cellules est un argument dans l'hypothèse d'une activité oestrogénomimétique.

### 1.3 Test de production des protéines :

Après une exposition aux oestrogènes, l'expression de gènes, comme ceux du récepteur à la progestérone (PR) ou de la protéine pS2, est induite spécifiquement dans des cellules du cancer du sein. L'oestradiol augmente l'expression de PR ou de pS2 de façon concentration dépendante et spécifique. Les protéines pS2, le récepteur à la



**Figure 17 :** Activation du récepteur aux oestrogènes dans le test de levure transfectée (d'après Gaido *et al.* 1997)

progestérone peuvent être quantifiées par des kits de dosage RIA (radio immuno assay). Il en va de même pour la synthèse de vitellogénine dans les hépatocytes de poisson. Les objectifs de chaque test sont très spécifiques et permettent de faire une distinction entre agoniste et antagoniste. Le principal inconvénient de ces essais est que le dosage des protéines induites par les oestrogènes implique souvent des méthodes assez lourdes et coûteuses en terme de mis en œuvre. Plusieurs laboratoires cependant, estiment que ce test est moins sensible aux oestrogènes que le test E-screen (Soto et Sonnenschein 1987 ; Katzenellenbogen *et al.* 1987).

#### 1.4 Test d'activation du récepteur aux oestrogènes (figure 17) :

La liaison du ligand sur le récepteur RE active l'interaction de celui-ci avec une séquence d'ADN spécifique appelée ERE et située en amont de gènes dont la transcription est régulée par les oestrogènes (Zacharewski, 1997). Cette activation sert de base à un test baptisé YES (Yeast Based ER assay) et qui permet de mesurer l'activité oestrogénique de certains composés à partir d'une souche de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) transfectées par un plasmide rapporteur constitué de deux copies d'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) et par un gène rapporteur inductible comme la luciférase, la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) ou la  $\beta$ -galactosidase (Coldham *et al.* 1997).

L'induction de l'activité du gène rapporteur est strictement dépendante de la présence de récepteurs des oestrogènes dans les souches de levures et de la concentration en oestradiol dans le milieu de culture. Les levures sont cultivées en présence du composé à tester. La potentialité oestrogénique du composé est déterminée dans l'extrait cellulaire de levure en mesurant l'activité du gène proportionnelle à l'expression génique ; coloration jaune dans le cas de la  $\beta$ -galactosidase, émission de lumière dans le cas de la luciférase (Picard, 2000).

L'utilisation des cellules de mammifères permet de déterminer des réponses spécifiques médiées par les récepteurs hormonaux de certains tissus ou espèces vis à vis des substances testées. Ainsi des cellules d'origine humaine, comme les cellules MCF-7 ou Hela peuvent aussi être transfectées (Gray *et al.* 1997). Ces tests sont faciles d'utilisation car ils consistent à doser l'activité enzymatique induite et reposent sur un mécanisme d'action des oestrogènes bien connu ; ces tests peuvent donc être adaptés à un large screening de





xénobiotiques. Mais le test sur levure recombinée ne permet pas toujours de distinguer une activité agoniste d'une activité antagoniste (Andersen *et al.* 1999).

### 1.5 Expression de gènes naturels :

Ce test consiste à déterminer le taux d'expression de certains gènes qui sont connus pour être oestrogéno-régulés. Cette méthode fait appel à des techniques immunologiques ou de RT-PCR. Il est également possible d'utiliser une multi-PCR quantitative ou des puces à ADN pour évaluer l'expression simultanée de plusieurs gènes et ainsi d'identifier les perturbateurs qui auraient des actions différentes sur l'expression des gènes hormono-régulés. L'analyse extensive des gènes dont l'expression est modulée peut conduire à terme à l'obtention de la signature de l'action de certains perturbateurs endocriniens.

## 2. Tests *in vivo* :

Nous avons vu précédemment les principales limitations des tests *in vitro* ; les résultats obtenus avec ces essais doivent donc être étendus et conduits sur des organismes entiers afin de prendre en compte les effets du métabolisme, de la liaison aux protéines, de la pharmacocinétique d'une molécule ainsi que des mécanismes de régulation hormonaux. Ils sont incontournables pour l'étude des effets sur le développement lors d'une exposition pendant la gestation. Certaines molécules peuvent être inactives *in vitro* mais actives *in vivo* en raison d'une métabolisation en composé actif. A l'inverse, une substance active *in vitro* peut être inactive *in vivo* en raison d'une dégradation *in vivo* en métabolites inactifs.

Les résultats obtenus avec ces essais permettent d'estimer les effets d'un composé, de les identifier, de les caractériser et de les quantifier ; les résultats obtenus peuvent être utilisés afin de déterminer les NOAEL associées.



## 2.1 Tests de synthèse de la vitellogénine chez le poisson mâle :

La vitellogénine est une lipoprotéine spécifique des animaux ovipares. Elle est produite dans le foie des oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons sous contrôle oestrogénique. Elle est transportée par voie sanguine jusqu'aux ovaires où elle est utilisée pour la production de vitellus. La synthèse de vitellogénine ne se fait normalement pas chez le poisson mâle ni chez la femelle immature mais peut être induite par des oestrogènes exogènes.

La synthèse de vitellogénine chez le poisson a été proposée comme marqueur d'une contamination oestrogénique dans l'environnement aquatique (Sumpter et Jobling, 1995). Les concentrations plasmatiques sont variables chez la femelle au cours du cycle de reproduction. Chez le mâle, elle n'est pas détectée ou 'est présente qu'en très faible quantité ; cependant, l'exposition des mâles à des quantités variables d'oestrogènes a pour conséquences une synthèse de vitellogénine dose-dépendante (Bromage et Cumaranatunga, 1988).

Ce test est très sensible et présente l'avantage de détecter de faibles quantités d'oestrogènes et donc de répondre à de faibles concentrations de xénobiotiques. De plus, il est directement applicable à la mise en évidence d'une contamination environnementale.

## 2.2 Test de la puberté chez le rat :

Ce test permet d'étudier l'activité thyroïdienne et oestrogénique (chez la femelle) ou androgénique (chez le mâle) d'agents chimiques administrés à des rats immatures durant la puberté. Ces essais reposent sur l'étude des éventuelles malformations ou anomalies de développement des organes sexuelles et des caractéristiques sexuelles secondaires (Gray *et al.* 2002).



### 2.3 Test d'utérotropie :

Ce test, introduit dans les années 30 est utilisé pour détecter l'activité (anti-) oestrogénique des composés et permet d'évaluer l'intensité de la liaison *in vivo* au ER. Ils sont réalisés la plupart du temps en parallèle sur la souris et la ratte. Un faible taux d'oestrogènes circulants est une condition indispensable à la réalisation des tests de détection d'une activité oestrogénomimétique d'où l'utilisation d'animaux immatures ou d'adultes ovariectomisés. L'exposition de l'utérus aux oestrogènes se traduit par une augmentation de son poids (Astwood, 1938 ; Lee *et al.* 1989), causée par une rétention d'eau, une hyperplasie et une hypertrophie. Ce test a permis l'étude des mycooestrogènes et des phytoestrogènes. Il a été appliqué dans l'étude des composés présents dans la nourriture. L'oestrogénicité de certains composés environnementaux a été mise en évidence par ce test (o'p'-DDT, métoxyclo, képone, PCB...).

### 2.4 Test de la cornification vaginale :

Le test de cornification des cellules vaginales (« Allen Doisy » test) ne nécessite pas le sacrifice des animaux contrairement au précédent et le nombre de cellules peut donc être suivi au cours du temps. Ce test est basé sur la kératinisation des cellules du vagin qui est spécifique d'une activité oestrogénique (Allen et Doisy, 1923). Une substance est considérée comme oestrogénique si des cellules cornées apparaissent deux à trois jours après l'administration du composé testé. Ce test a été appliqué pour étudier l'oestrogénicité d'un grand nombre de composés non stéroïdiens et de synthèse comme le DES. Plus récemment, il a été mis en œuvre pour étudier l'activité oestrogénique des bisphénols et alkylphénols.

### 2.5 Test de reproduction chez le poisson :

Il s'agit d'un test d'une durée de 42 jours, utilisé afin d'étudier les capacités oestrogéniques et anti-androgéniques d'un composé. Des poissons adultes sexuellement matures sont exposés à un agent chimique pendant 21 jours. L'essai s'applique ensuite à déterminer des variations dans le comportement sexuel des poissons ainsi que des



variations ou des atteintes des caractéristiques sexuelles secondaires et de la fécondité des adultes. (Eertmans *et al.* 2003).

Toute une batterie de tests de l'activité hormonale a donc été mise en place afin de traquer les composés présentant une activité perturbatrice du système endocrinien dont les plus utilisés restent le test E-screen et le test basé sur les gènes recombinants. Cependant la majorité des essais réalisés jusqu'à maintenant ne permettent d'étudier que la composante oestrogénomimétique, de plus les tissus cibles étudiés jusqu'à présent (prostate, cellules mammaires femelles, utérus...) ne sont pas représentatifs d'une action perturbatrice sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Des tests permettant d'évaluer d'autres types d'activité biologique, notamment des activités perturbatrices du système thyroïdien, tendent donc à être mis en place et utilisés de façon plus systématique ; on peut citer le Frog metamorphosis assay qui permet d'étudier le potentiel perturbateur du système thyroïdien d'un composé (Yaoita *et al.* 1997 ; Tietge *et al.* 2003).

#### **Comparaison des méthodes tests de l'activité oestrogénique, existence d'une variabilité inter tests et inter laboratoires :**

En 1999, plusieurs équipes de chercheurs ont testé une vingtaine de composés connus pour leur oestrogénicité à l'aide de différents tests à court terme : test E-screen, test d'expression des gènes, trois variantes de test YES différentes (souche de levure différente ou récepteur RE d'origine différente), test de production de vitellogénine et deux variantes du test de liaison compétitive au ER basé soit sur un RE humain recombinant, soit sur du tissu utérin de lapin (Andersen *et al.* 1999). Les résultats de cette étude ont fait apparaître des variations dans les résultats et la sensibilité de tests différents portant sur des composés identiques mais aussi des variations inter laboratoires entre tests et/ou composés identiques.

Si les composés de référence, à savoir DES, 17- $\beta$ -oestradiol et 17- $\beta$ -éthinyloestradiol ont donné des réponses positives à tous les tests, des variations sont apparues pour certains autres composés : dans le cas du tamoxifène par exemple, son affinité pour le RE humain recombinant est comparable à celle du 17- $\beta$ -oestradiol mais elle est seulement 1/6000<sup>ème</sup> cette dernière dans le test de liaison compétitive basé sur le RE de lapin. Par



**Tableau 8 :** Activités relatives de composés testés pour leur activité oestrogénique dans différents laboratoires à l'aide du test E-screen et du test sur levure recombinante (YES) ; les valeurs correspondent au rapport de la EC<sub>50</sub> du composé sur la EC<sub>50</sub> du 17-β-oestradiol (d'après Andersen *et al.* 1999).

Composé testé	Test E-screen			Test YES	
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
<b>17-β-oestradiol</b>	1	1	1	1	1
<b>17-β-éthinyloestradiol</b>	–	0.9	0.03	1.6	3.3
<b>Tamoxifène</b>	–	–	0.03	–	7.10 <sup>-4</sup>
<b>Bisphénol A</b>	3.10 <sup>-6</sup>	1.10 <sup>-5</sup>	5.10 <sup>-7</sup>	8.10 <sup>-5</sup>	4.10 <sup>-5</sup>
<b>4-n-Octylphénol</b>	2.10 <sup>-7</sup>	1.10 <sup>-6</sup>	2.10 <sup>-8</sup>	–	–
<b>4-n-Nonylphénol</b>	8.10 <sup>-8</sup>	7.10 <sup>-7</sup>	–	–	–
<b>p,p'-DDE</b>	1.10 <sup>-7</sup>	2.10 <sup>-7</sup>	1.10 <sup>-9</sup>	–	–
<b>Méthoxychlor</b>	2.10 <sup>-7</sup>	1.10 <sup>-6</sup>	–	2.10 <sup>-6</sup>	7.10 <sup>-6</sup>

ailleurs, sur les 20 composés testés, seuls 3 (hors les composés de référence) ont donné des résultats positifs dans ces deux tests (BPA, 4-*n*-NP et p,p'-DDE).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces variations : tout d'abord, l'existence de deux types de sous récepteurs du RE (RE $\alpha$  et RE $\beta$ ) dont l'expression et l'activité est différente en fonction des tissus étudiés pourrait expliquer ces résultats. Une autre hypothèse met l'accent sur des différences structurales existant entre les deux tests : RE isolé sans présence d'aucune autre structure cellulaire pour le RE humain recombinant à l'inverse du test sur le tissu utérin de lapin (présence de constituants cytosoliques, protéines...).

Concernant le test E-screen des variations de réponses ont été observées pour de mêmes composés (tamoxifène, testostérone, o',p'-DDT et p,p'-DDE) et entre trois laboratoires différents (tableau 8). Les souches cellulaires provenant du même stock, des différences dans la préparation du milieu de culture pourraient expliquer ces variations. Néanmoins, pour les autres composés testés, les réponses au test étaient comparables.

Dans le cas de l'o',p'-DDT, ces tests ont montré que la mise en place même de l'essai pouvait influencer sur le résultat. Ainsi ce composé donne une réponse moins importante sur le test sur levures comparativement à d'autres tests car son adhérence aux parois du récipient entraîne une diminution de sa disponibilité ; si l'o',p'-DDT est ajouté directement au milieu de culture des levures, la réponse est plus importante.

Un autre point important mis en avant par cette étude est l'utilisation de solvants (en particulier l'éthanol) qui pourraient modifier les réponses aux tests : ainsi dans une expérience, l'éthanol a induit la prolifération de cellules MCF-7. Deux hypothèses sont avancées : soit une réponse sporadique de l'essai à l'éthanol, soit plus probablement une problème de contamination du solvant par un composé oestrogénique. Une telle contamination ne pouvant être exclue, les auteurs suggèrent que l'oestrogénicité d'un composé ne soit reconnue que si les résultats obtenus ne sont reproductibles qu'au sein de plusieurs laboratoires.

En conclusion, ces résultats montrent que si l'on dispose d'outils valables et précis pour mesurer l'activité oestrogénique d'un composé, il existe une variabilité de réponse



entre les essais ; une standardisation et une mise en place méticuleuse est donc requise pour obtenir des résultats valables ainsi qu'une bonne reproductibilité entre laboratoires. Il semble que les tests de liaison au RE recombinant humain et que le test E-screen soient de bons choix pour réaliser des tests d'oestrogénicité de première intention. L'essai basé sur la production de vitellogénine chez le poisson mâle, s'il est plus coûteux et plus long à mettre en place reste un essai de référence car c'est un test *in vivo* réalisable sur un court terme.



**LE NONYLPHENOL,**

**PRESENTATION :**





## I. Le nonylphénol, présentation :

Le nonylphénol (NP) est un composé appartenant à la classe des alkylphénols (AP) dont il est le principal représentant. Il est obtenu industriellement par alkylation du phénol par un mélange d'isomères du nonène en présence d'un catalyseur acide ; le produit de réaction est constitué d'un mélange de congénères, en majorité des isomères *para*-substitués, caractérisés par différentes isoméries de ramification de la chaîne nonyle. Ces alkylphénols sont des composés très largement utilisés au niveau industriel, dans l'industrie des plastiques par exemple où ils sont utilisés pour leurs propriétés antioxydantes et assouplissantes. Ils facilitent le processus de polymérisation des composés acryliques et de certains acétates de vinyle.

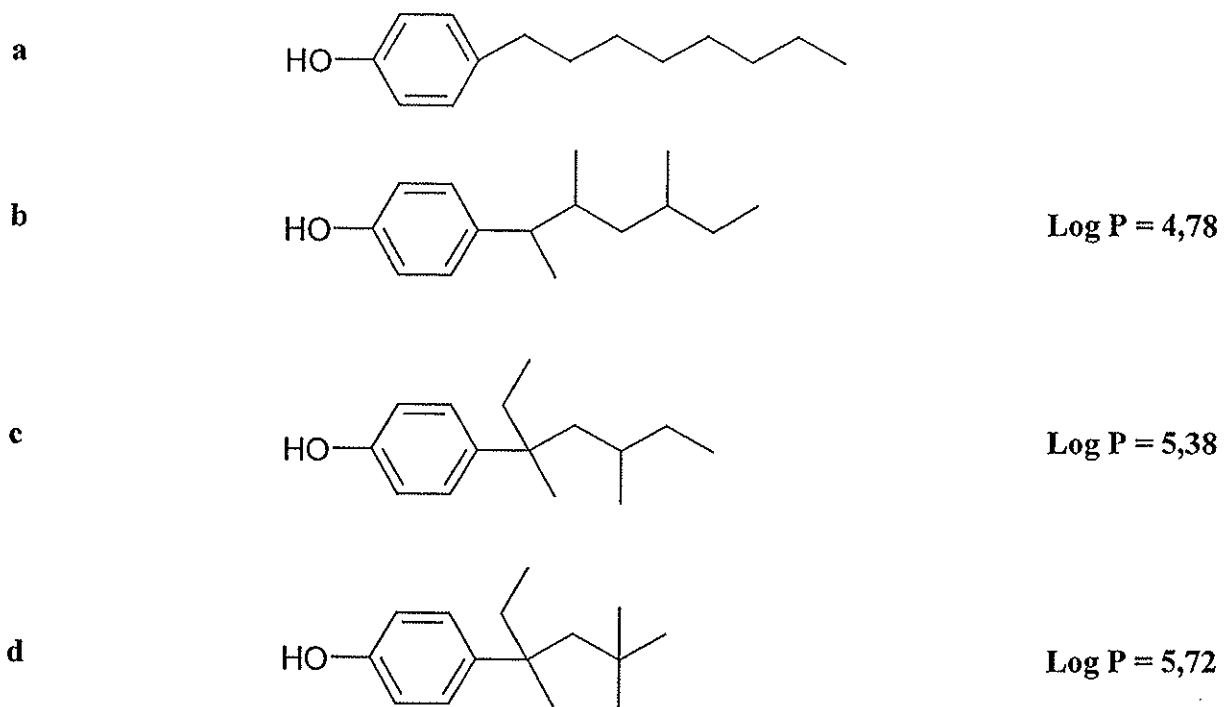
Le NP est donc en fait composé d'un mélange d'une vingtaine d'isomères linéaire et ramifiés, isomères de position et de ramification de la chaîne alkyle, dont tous n'ont pas les mêmes caractéristiques physicochimiques (figure 18 et tableau 9).

Une des principales application industrielle du NP reste la synthèse de nonylphénol polyéthoxylé (NPE), composé le plus représenté (85% de la production) des alkylphénols polyéthoxylés (APE) (Anonymous, 1997). Ces APEO sont des surfactants non ioniques ; utilisés pour leurs propriétés de réduction de tension de surface et de formation de micelles, ils entrent dans la composition de nombreux détergents industriels, dans l'industrie du textile par exemple, (laine en Australie) ou encore de manière extensive dans l'industrie du papier, où ils sont incorporés dans les processus de dissolution des fibres, pour la production mais aussi le recyclage du papier (Field *et al.* 1996). Par ailleurs ils sont utilisés en tant qu'agents mouillants (afin d'augmenter l'adhérence des composés actifs aux organismes cibles) ou émulsifiants dans la formulation de pesticides (en tant que diluant dans l'aminocarb par exemple) ; si l'on étudie les formulations des pesticides on retrouve la présence d'APEO dans 4195 composés présents sur le marché (Markey *et al.* 2001) 81% de ces APEO sont constitués par des dérivés du NP. On retrouve également ces agents dans la formulation galénique de certains médicaments afin d'en augmenter l'absorption intestinale ; certains encore, possédant des activités anti-microbiennes étaient utilisés comme biocides. A titre d'exemple, les NPEO à 4 ou 5 unités éthoxyles sont utilisés comme détergents et émulsifiants solubles dans les huiles; les NPEO à 13 ou 15 unités éthoxyles constituent des détergents utilisés dans l'industrie



**Figure 18** Structure chimique (a) du 4-n-nonylphénol (4-n-NP) et (b, c et d) d'isomères ramifiés *para*-substitués du NP avec leur log P estimé.

(Gundersen [22] d'après Wheeler).



**Tableau 9 .** Caractéristiques physico-chimiques du NP.

Formule brute	$C_{15}H_{24}O$
Poids moléculaire	220.3
Point de fusion	81-83°C
Point d'ébullition	295-320°C
pKa	10.7
Solubilité dans l'eau	5.4-6 mg/L
Log Kow	4.48
Couleur	Incolore à jaune pâle

$K_{ow}$ : coefficient de partage n-octanol-eau

textile. La chaîne hydrocarbonée fixée au phénol leur confère une habileté à dissoudre les substances organiques tandis que la partie éthoxylée leur assure leur solubilité dans l'eau (Odum *et al.* 1997).

Ils sont massivement utilisés depuis une quarantaine d'années pour leur efficacité, leur faible coût économique et leur facilité de formulation et d'utilisation ; environ 550 millions de tonnes sont produites par an (dont la majeure partie aux USA) pour un marché total de près de 525 millions de dollars. Il y a une dizaine d'années, 75000 tonnes de NP étaient utilisées par an en Europe. Environ 85% des APEO produits sont donc des NPEO, solubles dans l'eau (et susceptibles de se retrouver dans le milieu aquatique (Blackburn *et al.* 1999) et qui donnent après biodégradation le NP qui est retrouvé dans les boues de STEP (Ahel *et al.* 1994 ; Naylor, 1995).

Comme d'autres contaminants organiques de l'environnement (PCB, dioxines...), le NP possède une activité de perturbateur endocrinien et plus particulièrement une activité oestrogénique en interférant avec l'action ou le métabolisme des hormones sexuelles. Historiquement, cette activité a été découverte lors d'une étude (Soto *et al.* 1991) portant sur les effets proliférateurs des oestrogènes sur des cellules MCF-7 (cellules de tumeur du sein) dans laquelle l'utilisation de tubes à centrifugation en polystyrène entraînait une prolifération inattendue des cellules. Le NP utilisé comme antioxydant dans la fabrication de ces tubes et relargué par ces derniers fut identifié comme la substance oestrogénique responsable de cette prolifération.

## **II. Toxicité du nonylphénol :**

### **1. Sur les organismes des milieux aquatiques :**

#### **1.1 Toxicité aiguë :**

Le NP est un composé relativement peu toxique pour les organismes aquatiques. Il a été démontré qu'il avait des propriétés algicides ( $CL_{50}$  24 h de 2500 $\mu$ g/l chez *Chlamydomonas segnis*) par dénaturation des facteurs de division et blocage de la synthèse des pigments chlorophylliens.



Le NP est peu toxique pour le poisson ( $CL_{50}$  variant de 17 à 3000  $\mu\text{g/L}$ )

Chez *Daphnia magna*, la  $CE_{50}$  a été estimée à 0,18 mg/l ; le NP entraîne également des anomalies durant le développement des embryons et des juvéniles chez les animaux exposés prénatalement (Shurin et Dodson, 1997). Cependant, une étude plus récente (Zhang *et al.* 2003) suggère que malgré ses effets, le NP ne représente pas un risque significatif environnemental pour cette espèce.

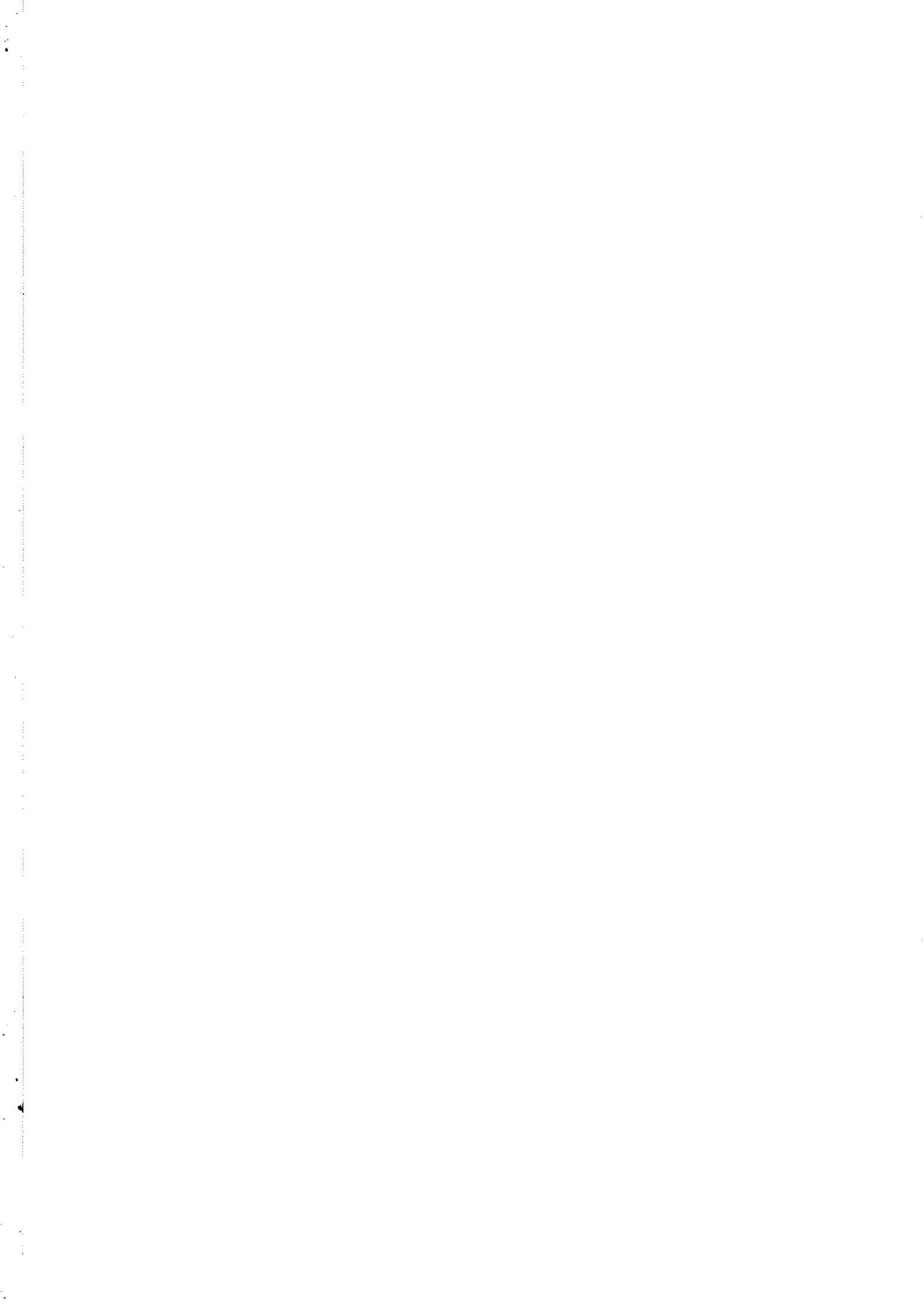
### 1.2 Toxicité à long terme, effets oestrogéniques (Markey *et al.* 2001) :

Des études effectuées sur un crustacé, *Coprophium volutator*, ont montré que si la  $CL_{50}^{96h}$  pour cet invertébré était de 1670 $\mu\text{g/L}$ , un mois d'exposition à des concentrations supérieures à 600 $\mu\text{g/l}$  affectait sa survie ; par ailleurs, des modifications morphologiques ont été observées chez des juvéniles exposés 3 mois à des concentrations de NP comparables à celles des conditions environnementales (Depledge et Billingham, 1999).

Chez les poissons mâles, l'administration de NP induit la synthèse de vitellogénine *in vitro* dans des hépatocytes (White *et al.* 1994) et *in vivo* à des concentrations respectives de 3 et 10 $\mu\text{g/l}$  chez des truites mâles (Jobling *et al.* 1996 ; Jobling et Sumpter, 1993). Chez les salmonidés juvéniles, le NP provoque la production de protéines de la *zona radiata*, un autre marqueur du phénotype femelle (Arukwe *et al.* 1998).

Par ailleurs, des troubles de la fonction de reproduction ont pu être mis en évidence chez des carpes mâles sexuellement matures exposées pendant la spermatogénèse (Gimeno, Komen et Gerritsen, 1998 ; Gimeno, Komen et Jobling, 1998).

Des études plus approfondies chez la truite ont montré que le NP est un agoniste au récepteur du 17- $\beta$ -oestradiol. La séquence codant pour le site de fixation du récepteur, très conservée au cours de l'évolution, explique que les effets sont les mêmes pour plusieurs espèces différentes (White *et al.* 1994). Chez des truites femelles juvéniles, le NP (pour des concentrations variant de 1 à 50 $\mu\text{g/l}$ ) réduit la croissance et affecte l'index gonadosomatique (Ashfield *et al.* 1998).



## **2. Sur les organismes végétaux :**

La phytotoxicité et le transfert des APEO et du NP ont été étudiés chez l'orge (Stoltzenberg *et al.* 1982), ce dernier a observé chez cette plante une réduction de la croissance et de l'activité photosynthétique.

Le 4-*n*-NP a été démontré comme étant toxique pour les plantes terrestres *in vitro* sur des cultures de cellules (Bokern et Harms, 1997), la CL<sub>50</sub> déterminée variant de 0,05 mM à plus de 1 mM en fonction des espèces testées. En 1989 Prasad a décrit une inhibition de la production des frondes, une réduction de la croissance et une baisse de l'activité photosynthétique chez des lentilles d'eau et des fougères flottantes.

Par ailleurs, il a été montré dans des études menées sur des cultures de racines que le NP était phytotoxique et que cette phytotoxicité variait en fonction de la présence ou non de micro-organismes dans les sols de culture. De plus, il a été montré qu'une augmentation de la concentration en NP accroissait le transfert de ce composé vers la plante. Il semble que ce composé s'accumule peu dans la plante mais majoritairement dans la racine (Bokern et Harms, 1998).

Une étude menée sur la carotte (Chatard, 1999) n'a pas montré d'effet phytotoxique pour la plante entière.

Plus récemment, une étude menée sur les effets du NP sur des champignons du sol après application de boues de STEP n'a montré aucun effet délétère marquant à court ou à long terme aux concentrations de ce composé retrouvé dans les boues, il a été conclu que le potentiel du NP à exercer des effets néfastes sur les champignons du sol demeurerait faible (Kollmann *et al.* 2003).

## **3. Chez les invertébrés terrestres :**

En 1997, l'Union Européenne a estimé la PNEC du NP dans les sols à la valeur de 0,069 µg/g pour les organismes terrestres, cette valeur ayant été calculée en admettant que les organismes du sol avaient une sensibilité au 4-NP identique aux organismes aquatiques.

**Tableau 10 :** LOEC et EC<sub>10</sub> (en ng de NP/ kg de sol) du NP observées après exposition de *Folsomia fimetaria* à trois régimes différents d'application du NP dans le milieu (d'après Scott-Fordsmand et Krogh, 2003).

EFFET	LOEC	EC <sub>10</sub>
<b>Survie des adultes</b>		
• R1, femelles	> 100	32
• R1, mâles	80	94
• R3	> 285	-
<b>Croissance des adultes</b>		
• R1, femelles	100	35
• R1, mâles	60	51
• R2, femelles	100	68
• R2, mâles	> 150	> 150
• R3, mâles et femelles	285	19
<b>Nombre de larves</b>		
• R1	60	23
• R2	25	6
• R3	> 285	19

R1 : NP appliqué de manière homogène dans le sol.

R2 : NP appliqué *via* des boues de STEP, les boues étant homogénéisées avec le sol.

R3 : NP appliqué *via* des boues de STEP, sans homogénéisation.

Une étude réalisée sur *Folsomia fimetaria* (collembole) a déterminé que la CE<sub>10</sub>, la NOEC et la LOEC variaient en fonction du stade de développement de l'organisme, de leur sexe mais aussi du mode d'introduction du NP dans le sol ; selon que ce dernier est appliqué directement de manière homogène ou par l'intermédiaire de boues de STEP. Dans le cas des boues, l'activité du NP varie encore selon que les boues sont appliquées de manière homogène ou non (tableau 10).

#### **4. Chez les mammifères :**

##### 4.1 Toxicité aiguë :

La toxicité aiguë du NP chez le rat est assez faible : la DL<sub>50</sub> chez le rat est de 1,475g/kg (De Jager *et al.* 1999a,b) tandis qu'une NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) orale (calculée sur 90 jours) a été estimée à 50 mg/j/kg (Cunny *et al.* 1997). Des injections intra-péritonéales de NP chez le rat de 60 mg/kg ont entraîné des effets hépatotoxiques (Zumbado *et al.* 2002).

Des études portant sur des cultures de macrophages ont suggéré une possible action immuno-suppressive du NP, par réduction de la production de NO et de TNF $\alpha$  (You *et al.* 2002).

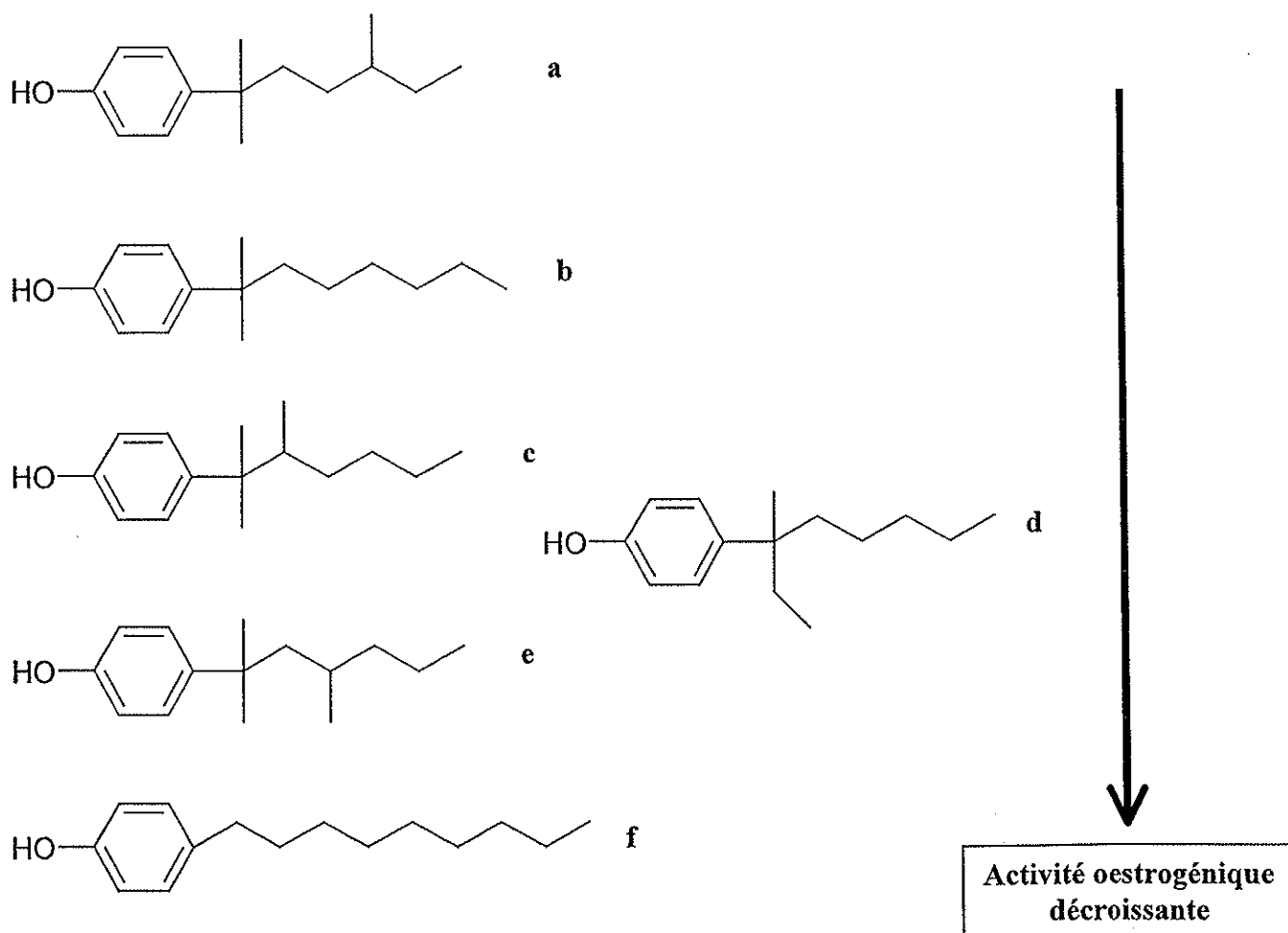
##### 4.2 Toxicité à long terme, effets oestrogéniques :

Chez le rat femelle immature, le NP peut induire une augmentation de l'activité mitotique et une croissance de l'utérus (Odum *et al.* 1997).

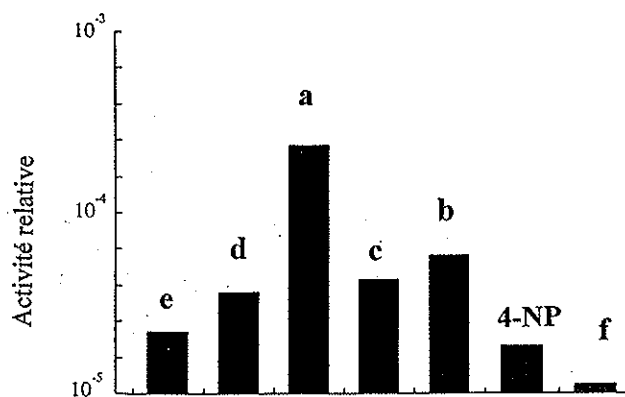
Les fonctions de reproduction de rats mâles sont affectées par l'exposition au NP à des doses importantes de 100 à 400 mg/kg (De Jager *et al.* 1999 I et 1999 II). Des anomalies testiculaires sont rapportées chez des rats immatures traités par injection péritonéale et chez des rats mâles exposés au NP *via* la lactation.



**Figure 18b :** Variation de l'activité oestrogénique de différents isomères du 4-NP (d'après Kim *et al.* 2004).



**a, c, d et e** sont des isomères séparés à partir du 4-NP commercial.  
**b** a été synthétisé par l'équipe de Kim *et al.*  
**f** est l'isomère linéaire du NP (4-*n*-NP) disponible dans le commerce.



**Figure 18 c :** Activités relatives des différents isomères du 4-NP par rapport à celle de l'oestradiol.

Des perturbations similaires sont susceptibles de se produire chez les oiseaux et les reptiles exposés au NP. White *et al.* (1994) ont suggéré l'oestrogénicité des AP chez les oiseaux, par des expériences *in vitro* sur des fibroblastes d'embryon de poulet.

Une étude bi-générationnelle menée chez le rat a montré des modifications histopathologiques au niveau du foie et des reins. La NOAEL sur les capacités reproductives a été estimée à 50 mg/kg/j voire plus chez les animaux parents et seulement de 10 mg/kg/j chez ceux appartenant à la génération suivante (Nagao *et al.* 2001).

### **III. Des isomères à activité oestrogénique variable :**

Comme nous l'avons vu précédemment, le NP est en fait un mélange complexe de plusieurs isomères dont la majeure partie est composée de dérivés *para*-substitués ; parmi ces congénères *para*-substitués on retrouve de nombreux isomères de ramification de la chaîne alkyle. Or nous avons vu que les relations structure-activité sont très complexes dans le cas des perturbateurs endocriniens et que l'activité oestrogénique peut varier en fonction des substituants, qu'en est il des isomères du NP ?

Une étude réalisée par Kim *et al.* (2004) portant sur la séparation d'isomères du NP et la détermination de leur potentiel oestrogénique (par utilisation du test sur levure recombinante) a montré que les isomères du NP possédaient des activités oestrogéniques différentes. Tout d'abord, le 4-*n*-NP, isomère linéaire utilisé dans de nombreuses études présente un pouvoir oestrogénique plus faible que celui du NP commercial ou que celui de tous les isomères ramifiés testés. Par ailleurs, l'activité varie de manière importante au sein des isomères ramifiés, isomères qui présentaient tous dans cette étude un carbone tertiaire en  $\alpha$  du cycle aromatique ; pour les auteurs, la présence d'une structure tertiaire dans la molécule joue un rôle important dans le potentiel oestrogénique.

Les auteurs concluent que l'activité oestrogénique est fonction de la position de la chaîne (*para* > *meta* > *ortho*) et des ramifications de la chaîne (structure tertiaire > secondaire = primaire). Les positions des substituants sur la chaîne alkyle ne permettent pas de prévoir avec précision des variations de l'activité en fonction de ces différentes configuration ; ainsi si



la présence de ramifications nombreuses de la chaîne semble entraîner une baisse du potentiel oestrogénique, la variation de position d'un seul substituant alkyle sur la chaîne entraîne des modifications importantes de l'activité.

Par exemple, pour un isomère dont le carbone en  $\alpha$  du cycle est tertiaire et dont le reste de la chaîne est linéaire à 5 carbones avec un seul substituant méthyl, l'activité oestrogénique est maximale pour un méthyl en position 4 sur la chaîne, moitié moindre pour un méthyl en position 2 et encore plus faible pour un méthyle en position 3.

## **IV. Pharmacocinétique et métabolisme du NP:**

### **1. Sources d'exposition possibles :**

L'exposition humaine au NP peut être consécutive à l'exposition à plusieurs sources ; l'absorption par voie cutanée, par ingestion ou encore par inhalation. L'exposition par voie orale pourrait se faire de plusieurs manières : par ingestion d'eau contaminée par du NP (Clark *et al.* 1993), ou bien par absorption d'aliments contaminés soit directement (poisson contaminé par exemple), soit indirectement par relargage du NP depuis les films et emballages alimentaires vers les aliments (Guenther *et al.* 2002). Une autre source de contamination pourrait être celle de végétaux contaminés par du NP par la pratique de l'épandage des boues de station d'épuration utilisées comme agent fertilisant des sols cultivés.

L'exposition cutanée pourrait trouver son origine dans l'utilisation de produits cosmétiques renfermant des APEO (dont le NPEO), ou encore par contact avec des vêtements et autres textiles lavés avec des détergents dont la formulation contiendrait des NPEO (à noter que cette dernière source d'exposition semble peu probable dans la mesure où les NPEO sont interdits en Europe dans les détergents à usage ménagers). *A priori*, il semble que seule la voie orale ait été étudiée à ce jour comme source plausible de contamination de l'homme.



## 2. Pharmacocinétique du NP chez l'homme :

Müller *et al.* (1998) ont étudié le comportement pharmacocinétique du NP chez des volontaires sains suite à des administrations orales et intraveineuses (IV). Des prélèvements de tissu adipeux ont été réalisés sur d'autres sujets afin d'étudier l'accumulation du NP dans l'organisme humain.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer pour le NP une demi-vie d'environ 2 heures (administration orale). Une décroissance rapide des concentrations sériques (626 pg/g de sang 35 min après l'injection) de composé parent est observée avec une disparition du composé au bout de 10 heures (au bout de 10 heures la concentration en NP parent passe en deçà de la limite de détection de 10 pg/g de sang. On note la présence d'une faible proportion de composés conjugués qui décroît moins rapidement dans le temps (117 pg/g de sang à 35 min et 27 pg/g de sang au bout de 10 heures).

L'administration *per os* de NP donne les résultats suivants : un pic sérique de composé parent 60 min après l'ingestion puis une décroissance rapide des concentrations en NP parent (de 650 pg/g de sang à 35 min à 33 pg/g de sang à près de 10 heures). La demi-vie est là aussi estimée à 2 heures. Concernant les dérivés conjugués, ils sont logiquement présents en plus grande proportion que lors de l'administration IV et leur concentration sanguine suit la même décroissance que celle du composé parent (de 86040 pg/g de sang à 35 min à 825 pg/g de sang au bout de 10 heures). Par ailleurs, cette étude donne une valeur de la biodisponibilité du NP chez l'homme qui est estimée à 20%.

Concernant l'élimination urinaire du NP, plus de 95% du composé parent présents dans le sang (résultant du NP parent non métabolisé et du clivage des dérivés conjugués) sont éliminés dans les huit heures suivant l'ingestion. Néanmoins ces résultats montrent aussi que seuls 10% de la dose administrée sont éliminés par cette voie, (que ce soit sous forme de composé parent ou de dérivé glycuconjugué ou sulfoconjugué) l'absorption gastro-intestinale du NP étant selon les auteurs quasiment totale, le NP doit être métabolisé sous forme d'autres composés qui n'ont pas été détectés dans cette étude.



Des prélèvements de tissu adipeux effectués sur 25 autres sujets font état de concentrations variant de 19,8 ng à 84,4 ng de NP par g de lipide, ces valeurs se confondent cependant avec les valeurs obtenues lors des essais à blanc et sont selon les auteurs surévaluées, suggérant que le NP ne s'accumule pas dans le tissu adipeux. Néanmoins le volume de distribution calculé est de 2800 l, le NP migrerait donc largement dans le tissu adipeux après administration et distribution aux différents compartiments de l'organisme.

### 3. Métabolisme du NP chez le rat :

Zalko *et al.* (2003) ont étudié le métabolisme du NP (en fait de son isomère linéaire, le 4-*n*-NP) chez le rat. Celui-ci est transformé de manière importante en dérivés conjugués issus de plusieurs métabolites. La majorité des composés a été retrouvée dans les urines et les fèces. Les métabolites proviennent de deux voies de dégradation principales : l'oxydation et l'hydroxylation de la chaîne carbonée. Les réactions de  $\beta$ -oxydation (et d' $\omega$ -oxydation) de la chaîne alkyle conduisent à la formation de métabolites à chaîne carbonée plus courte dont seuls des congénères comptant 3 carbones ou moins sur la chaîne ont été détectés ; le produit final de la réaction étant l'acide *para*-hydroxybenzoïque. Tous les métabolites obtenus selon cette voie sont présents sous forme de dérivés conjugués sur le phénol (dérivés glycuconjugués et sulfoconjugués) ; la conjugaison pouvant avoir lieu avant ou après l'oxydation de la chaîne. La seconde voie métabolique emprunte les réactions d' $\omega$ -hydroxylation de la chaîne alkyle suivie par la formation de dérivés glycuconjugués sur le phénol. Enfin, il a été relevé la présence de métabolites résultant de l'hydroxylation du cycle aromatique, suggérant que le métabolisme du NP pouvait aussi emprunter la voie des catéchols.

Cette étude, aussi menée sur des rats femelles gestantes, n'a pas fait état d'un passage du NP ou de ses métabolites au travers de la barrière placentaire.



Tableau 11 : Contamination de l'environnement par le NP (d'après Bennie, 1999).

Milieu	Concentration		Lieu
	(eau / effluent µg/l)	(sédiment / boue µg/g)	
effluents d'épuration	1-14		Suisse
effluents d'épuration	0,7-2,6		Italie
effluents d'épuration	<0,2-330		U.K.
boues d'épuration	1500		Suisse
boues d'épuration	20-350		Barcelone - Espagne
boues d'épuration	30-4000		U.K.
boues d'épuration	370		Los Angeles
boues d'amendement des sols	2,72		Ontario - Canada
boues d'amendement des sols	1,6		Suisse
eau douce	0,7-26		rivières - Suisse
eau douce	1,2-3,4		lac Léman - Suisse
eau douce	<0,9-180		rivières - U.K.
eau douce	N:D-11.7		Llobregat - Catalogne, Espagne
eaux souterraines	<0,1-33		Glattfelden et Engleburg Suisse
eau de boisson	N:D-0,14		Barcelone - Espagne
sédiment	0,17-72		lac Ontario - Canada
sédiment	6-69		mer Méditerranée - Barcelone Espagne

## **V. Rejet du nonylphénol dans l'environnement et sources de contamination:**

### **1. Sources de contamination :**

De par son utilisation dans la fabrication de certains plastiques (PVC, polystyrène), le NP peut être relargué lors du contact de l'eau et des denrées alimentaires : contamination de l'eau du robinet à Barcelone par exemple (Guardiola *et al.* 1991). D'autres travaux plus anciens (Junk *et al.* 1974) ont montré que le NP était relargué depuis des tuyaux en PVC utilisés pour le traitement du lait. Une étude qui a déclenché une controverse a suggéré que le NP était retrouvé de manière ubiquitaire dans la nourriture (Degen et Bolt, 2003 ; Guenther *et al.* 2002, 2003). Une autre étude (Inoue *et al.* 2001) a conclu au possible transfert du NP vers les denrées alimentaires depuis les films plastique les recouvrant.

Le NP et les autres AP proviennent de la dégradation du NPEO et d'autres APEO par les bactéries de l'environnement et les traitements des boues de station d'épuration ; la voie majeure d'entrée du NP reste les boues de STEP (90% contre 10% d'entrée par les eaux usées) et contribue pour 40% à la contamination de l'environnement par les AP. Le sol est contaminé par la pratique de l'épandage dans les champs, le milieu aquatique est contaminé lors du lessivage de ces sols, par introduction directe des boues dans le milieu marin (Marcomini *et al.* 1990) et principalement par le rejet d'effluents industriels contenant du NP.

**NB** : Une étude menée sur la présence du NP et d'autres contaminants dans plusieurs sols (Vikelsøe *et al.* 2002) a conclu à la présence de NP dans des sols normalement préservés, suggérant ainsi la possibilité d'un transfert atmosphérique.

### **2. Contamination de l'environnement aquatique par le NP :**

De nombreuses études ont rapporté la présence de NP et de NPEO dans l'environnement aquatique de plusieurs pays. Les concentrations relevées dans les eaux pour le NP font état de valeurs de l'ordre de quelques ppb (le plus souvent) mais pouvant atteindre 180 ppb pour les sites les plus contaminés. Dans les sédiments dulcicoles et marins par contre,

Composé	Organisme	Concentration dans les organismes (µg/g)	Lieu
NP	plante ( <i>Cladophora glomerata</i> )	3.5-3.8	rivières - Suisse
NP	plante ( <i>Fontinalis antipyretica</i> )	4.2	rivières - Suisse
NP	plante ( <i>Potamogeton crispus</i> )	2.5	rivières - Suisse
NP	Beluga ( <i>Delphinapterus leucas</i> )	0.02-0.12	St-Laurent - Canada
NP	canard ( <i>Anas boscas</i> )	0.03-1.2	rivières - Suisse
NP	poisson ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	0.15-1.6	rivières - Suisse
OP	Beluga ( <i>Delphinapterus leucas</i> )	ND	
OP	poisson ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	ND	rivières - Suisse
NP1E	plante ( <i>Fontinalis antipyretica</i> )	0.9	rivières - Suisse
NP2E	plante ( <i>Cladophora glomerata</i> )	1.3-29	rivières - Suisse
NP2E	plante ( <i>Fontinalis antipyretica</i> )	0.6	rivières - Suisse

**Tableau 12 :** Contamination des organismes aquatiques par les AP et les APE (d'après Bennie, 1999).

NP : Nonylphénol

OP : Octylphénol

NP1E : NP monoéthoxylé

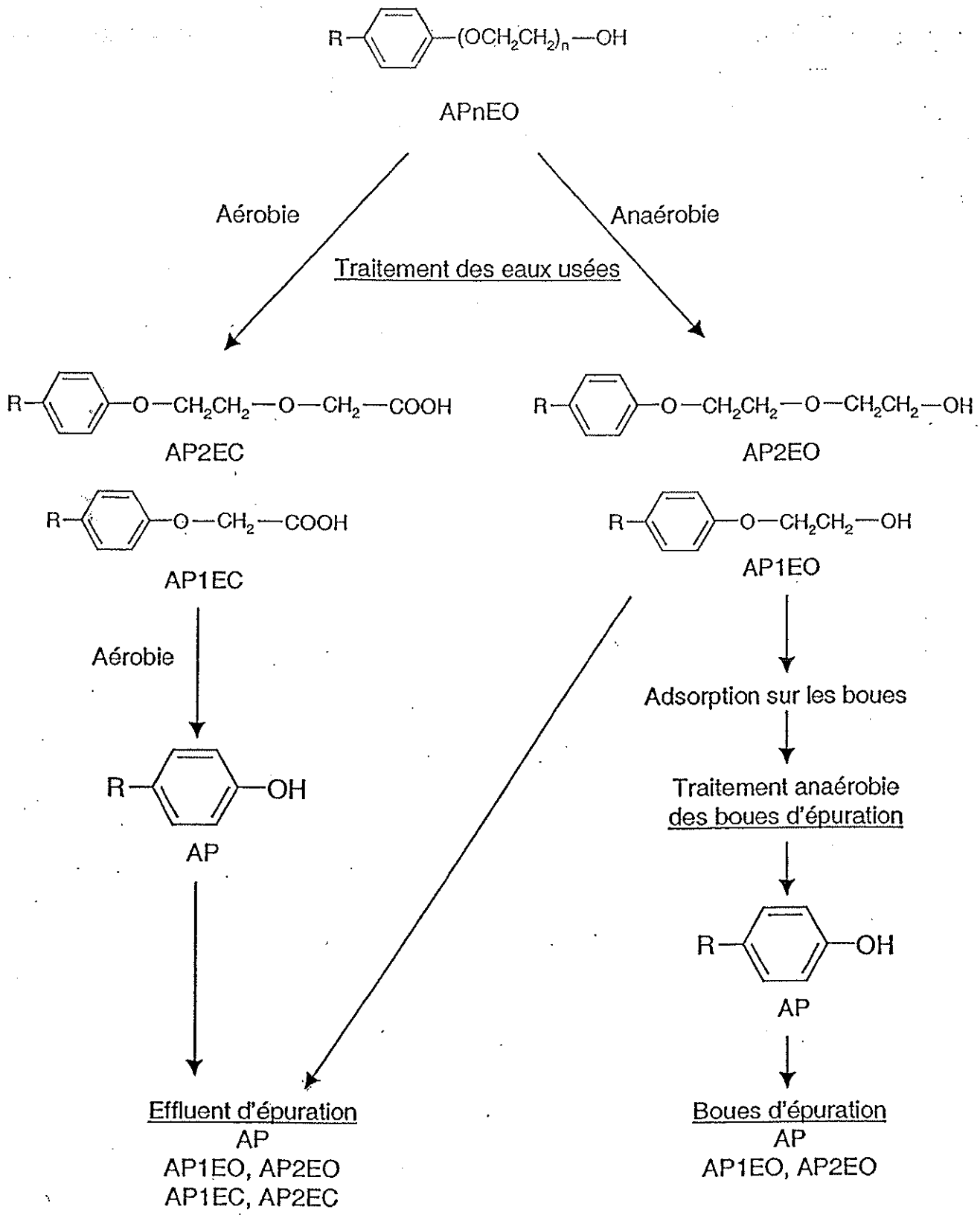
NP2E : NP diéthoxylé

ces concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de ppm. La dégradation du NP dans l'eau de mer en l'absence de sédiment est lente les quatre premières semaines (temps nécessaire à l'acclimatation microbienne, composante indispensable de la dégradation du NP) puis s'accélère après ce temps (Ekelund *et al.* 1993). La demi-vie de biodégradation du NP dans les eaux de surface a été estimée par la U.K. Environment Agency à 30 jours, néanmoins, d'autres études (Heinis *et al.* 1999) ont déterminé des demi-vies plus importantes et qui augmenteraient avec les concentrations en NP retrouvées (jusqu'à 104 jours pour des mésocosmes exposés à 300 ppb de NP). La dégradation du NP en milieu aérobie est plus rapide qu'en milieu anaérobie. Dans les eaux souterraines enfin, où les possibilités de dégradation sont moins importantes que pour les eaux de surfaces, le NP pourrait persister plus longtemps. Barber *et al.* (1988) suggéraient une possible persistance du composé dans des eaux souterraines contaminées de l'ordre de 30 ans.

### **3. Les boues de STEP, principale source de contamination du milieu terrestre :**

Dans les STEP, le traitement des eaux usées conduit à la formation de boues en quantité considérable. En moyenne, un Français produit 200 litres d'eaux usées par jour correspondant à 5 l de boues soit 42 g de matière sèche. En France toujours, un peu plus de 13000 STEP génèrent une production de boues estimée à 850000 tonnes par an (matière sèche).

En 1995, environ 60% des boues étaient valorisées en agriculture, 15 à 20% étaient incinérées (avec formation d'un résidu à éliminer) et 20 à 25% mises en décharge, la première solution étant économiquement la plus rentable et théoriquement la plus respectueuse de l'environnement : les boues améliorant la structure des sols (amendement) et présentant un haut pouvoir fertilisant. Depuis 2002 cependant la loi interdit la mise en décharge des boues, contribuant à augmenter la part des boues recyclées par épandage. Par ailleurs, une loi devant entrer en vigueur en 2005 concernant l'achèvement de raccordement du réseau des eaux usées entraînera une augmentation de la production des boues, production estimée à 1,3 millions de tonnes par an en matière sèche à l'horizon 2005.. Or le traitement des boues est variable d'une station à l'autre, une stabilisation des boues en anaérobiose par exemple entraîne une accumulation du NP qui n'est plus dégradé (Giger *et al.* 1984). Le NP



**Figure 19 :** Biodégradation des nonylphénols polyéthoxylés au cours du traitement des eaux usées (d'après Maguire, 1999).

- AP : alkylphénol
- APEO : alkylphénol éthoxylé
- APEC alkylphénol éthocarboxylé.

est donc susceptible de se retrouver en quantité non négligeable, jusqu'à 225 mg/Kg pour des boues d'origine industrielle (Gejlsberg *et al.* 2001), dans ces boues et donc d'entraîner une contamination du sol.

#### **4. Dégradation et rémanence du NP dans les sols :**

Dans le sol, la demi-vie du NP semble varier en fonction de la teneur en matières organiques. Ainsi une étude (Topp et Starratt, 1999) portant sur la dégradation du 4-*n*-NP dans différents sols fait état d'une minéralisation rapide du composé et estiment sa demi-vie de 4.5 à 16.7 jours en fonction du sol étudié. Par ailleurs cette étude montre que la dégradation du NP est d'origine microbienne, selon les auteurs les bactéries du sol utiliseraient le NP comme source d'énergie et de croissance. Dans les boues de station d'épuration, la dégradation est plus lente et proviendrait selon les auteurs d'une moins bonne oxygénation du milieu. Marcomini *et al.* (1989) ont étudié la dégradation du NP dans des sols amendés par des apports de boue liquide et ont déterminé qu'au bout de 3 semaines, seuls 20% de la quantité initiale restaient présents. La demi-vie pour la biodégradation dans le sol du NP a été estimée à 30 jours par la U.K. Environment Agency ; cependant le NP est considéré comme polluant persistant dans l'environnement en l'absence d'oxygène.

Cette demi-vie pourrait être augmentée de manière significative lorsque le NP est adsorbé à des matières organiques. A ce titre, le NP adsorbé sur les matières organiques des boues de STEP persisterait bien plus longtemps dans l'environnement. Hesselsoe *et al.* (2001) ont montré que la taille des agrégats de boues contenant du NP et par là même la disponibilité en oxygène dans ces agrégats étaient des facteurs influençant fortement le temps de demi-vie du NP : dans cette étude il ressort que si le NP est dégradé en 40 jours en présence d'oxygène dans des milieux homogénéisés, il persiste plus de 3 mois dans des agrégats de boues et pourrait persister plus longtemps (le temps que des conditions aérobies se mettent en place dans ces agrégats). Par contre si le NP est persistant dans les boues et/ou les sols riches en matières organiques, il reste fortement adsorbé sur ces dernières ; il n'est donc *a priori* pas disponible pour les organismes terrestres à moins que ceux-ci ne soient mis directement en contact avec des agrégats contaminés par du NP.



La quantité de boue contaminée par du NP appliquée sur un sol serait un facteur influençant fortement la rémanence du NP dans ces sols : en dessous d'une certaine quantité d'amendement (environ 4 tonnes de poids sec/hectare/année) le NP est dégradé et ne s'accumule pas plus que dans des sols non traités par des boues. Par contre dans des sols lourdement amendés (17 tonnes de poids sec/hectare/année), le NP s'accumule et persiste jusqu'à 8 ans après que les amendements aient cessé (Vikelsøe *et al.* 2002).

## **VI. Objectifs de l'étude :**

Si le métabolisme du NP a été étudié et décrit chez l'animal, chez le rat par exemple (Zalko *et al.* 2002) et chez les organismes aquatiques (Thibault *et al.* 2000 ; 1998) peu de recherches ont été effectuées sur son transfert et son devenir chez la plante, la question ayant principalement été abordée à l'échelle cellulaire (Bokern *et al.* 1996). Un des buts de cette étude est donc d'étudier le comportement de cette molécule vis-à-vis de plantes cultivées. Bokern et Harms (1998) ont rapporté que les plantes étaient capables de mobiliser à partir du sol du 4-n-NP (isomère non ramifié du NP) et de le transporter des racines vers les pousses. De plus, le risque de transfert du NP chez la plante étant réel mais n'ayant été pour l'instant abordé que sur des cultures de racines (Bokern et Harms, 1998), il paraît nécessaire d'étudier ce transfert sur la plante entière et dans des conditions se rapprochant de celles retrouvées dans l'environnement. Les études réalisées sur divers pesticides ont largement démontré les capacités de métabolisation des plantes ; cependant concernant l'élimination des xénobiotiques et de leurs métabolites, les plantes ne possèdent qu'un système excréteur limité. Les xénobiotiques sont donc susceptibles de subir des réactions de métabolisation durant une période plus longue.

Enfin, cette étude s'inscrit dans le cadre du projet de recherches PNETOX 2 qui vise à étudier l'influence de l'amendement des sols par des boues de station d'épuration sur les plantes de culture ; les boues de station d'épuration (STEP) renfermant une teneur non négligeable en NP et en autres composés potentiellement toxiques tels que les pesticides (diuron, glyphosate...), il est nécessaire d'étudier le transfert éventuel du NP depuis ces boues vers les plantes ainsi que la possible influence de tels amendements sur le transfert et éventuellement le métabolisme du NP chez la plante afin d'évaluer le risque d'impact pour les plantes et/ou le consommateur.





PARTIE

EXPERIMENTALE





## INTRODUCTION

L'expérimentation suivante a pour but d'étudier le comportement du nonylphénol vis-à-vis des plantes, en particulier des plantes cultivées et destinées à la consommation. Il s'agit d'étudier et de quantifier l'absorption du NP par la plante ainsi que d'étudier son devenir chez celle-ci. Nous avons vu précédemment que les plantes, si elles sont capables de métaboliser les xénobiotiques, ne les éliminent que de manière limitée, nous allons donc chercher à savoir dans quelles limites le NP est absorbé par la plante et quelles sont les quantités qui seraient susceptibles d'être ensuite transmises à l'homme. Il nous faut aussi déterminer sous quelle forme sont stockés les métabolites (afin d'évaluer leur biodisponibilité pour le consommateur) et déterminer leur structure afin d'évaluer leur activité oestrogénique ; ceci afin de savoir si ces métabolites représentent ou non un danger pour le consommateur. Le schéma général de l'étude expérimentale est le suivant : des plantes seront semées sur des sols contaminés par un apport de NP et son absorption par les plantes sera déterminée au bout d'un certain temps par les techniques appropriées.

Toute l'étude repose sur l'utilisation d'un traceur radioactif : il s'agit d'un isomère linéaire du NP, le 4-*n*-NP (rappelons que le NP est constitué d'un mélange d'une 20<sup>aine</sup> d'isomères) qui est marqué au carbone 14 sur le cycle aromatique. L'utilisation d'un traceur radioactif permet de suivre le composé tout au long de son évolution (absorption, transfert, métabolisation) et permet de réaliser des études quantitatives et qualitatives : par comptage en scintillation liquide, on pourra déterminer la quantité de radioactivité absorbée dans les différentes parties de la plante (feuilles et racines) ; par chromatographie liquide (CLHP) couplée à un détecteur de radioactivité, on étudiera après leur extraction la structure des métabolites ainsi que leurs proportions respectives.

Plusieurs expérimentations sont mises en place en parallèle :

- Des cultures de cellules sont mises en place pour étudier le métabolisme du NP dans des cellules végétales.
- Des plantations sont réalisées en conditions hydroponiques afin de limiter les interactions entre le NP et le sol, ce qui permet de donner une première

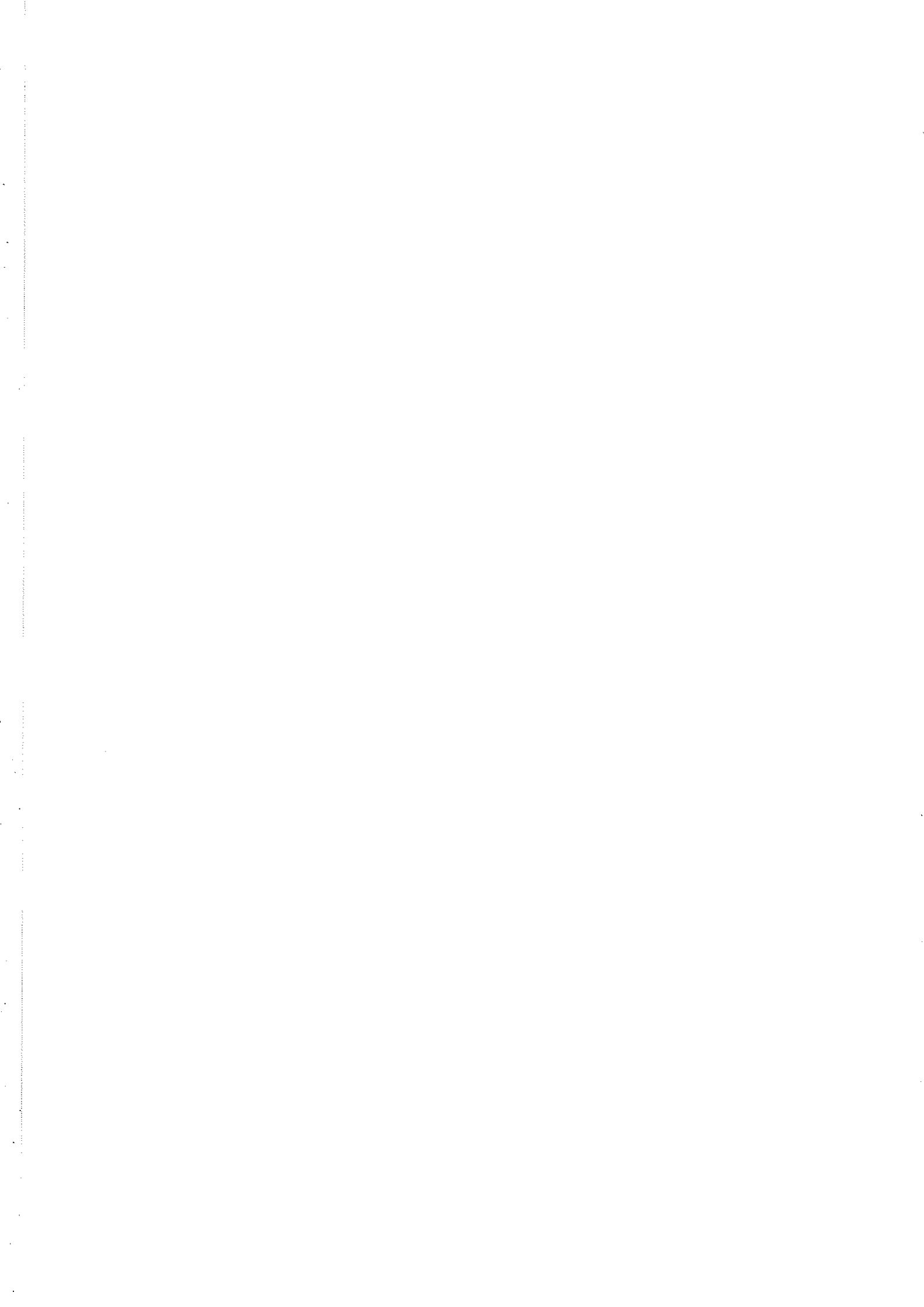


image du comportement du NP débarrassée des phénomènes d'adsorption et de dégradation par les bactéries de l'environnement.

- Des plantations en sol contaminé, afin de se rapprocher des conditions environnementales.
- Enfin, des plantations sur sol amendé par des boues de STEP contaminées par du NP afin d'étudier le comportement du NP et son absorption par la plante sur ce type de sol.

L'évolution du NP dans le temps et dans les plantes est suivie par comptage en scintillation liquide. Son absorption est déterminée pour les différentes parties de la plante (feuilles et racines). Le comptage se fait après extraction du NP et de ses métabolites par des solvants organiques. Les solvants organiques permettent l'extraction des résidus dits solubles c'est-à-dire des résidus stockés dans la vacuole des cellules. Les autres résidus, dits liés, car ils sont fixés aux parois cellulaires ne peuvent être extraits. Le comptage se fait donc directement pour les résidus solubles et après une étape de combustion et de solubilisation pour les résidus liés.

L'étude des métabolites se fait après purification et concentration des extraits organiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à un détecteur de radioactivité qui permet de séparer les différents métabolites du mélange et qui fournit les premières informations sur la structure de ces derniers. Pour obtenir une structure détaillée des composés, il faut ensuite recourir à des techniques de pointe comme la Spectrométrie de Masse et la Résonance Magnétique Nucléaire.



# **MATERIEL ET METHODES**

## **I. Matériel :**

### **1. Matériel végétal :**

Trois types de plantes ont été utilisés : les graines de blé (*Triticum aestivum* cv Apache) ont été données par le Dr A. Bouniols (INRA, Toulouse), les graines de radis (*Raphanus sativum* cv Fluo HF1) et les graines d'épinard (*Spinacea oleracea* cv Space HF1) sont de la marque Vilmorin France. Toutes les graines sont non traitées.

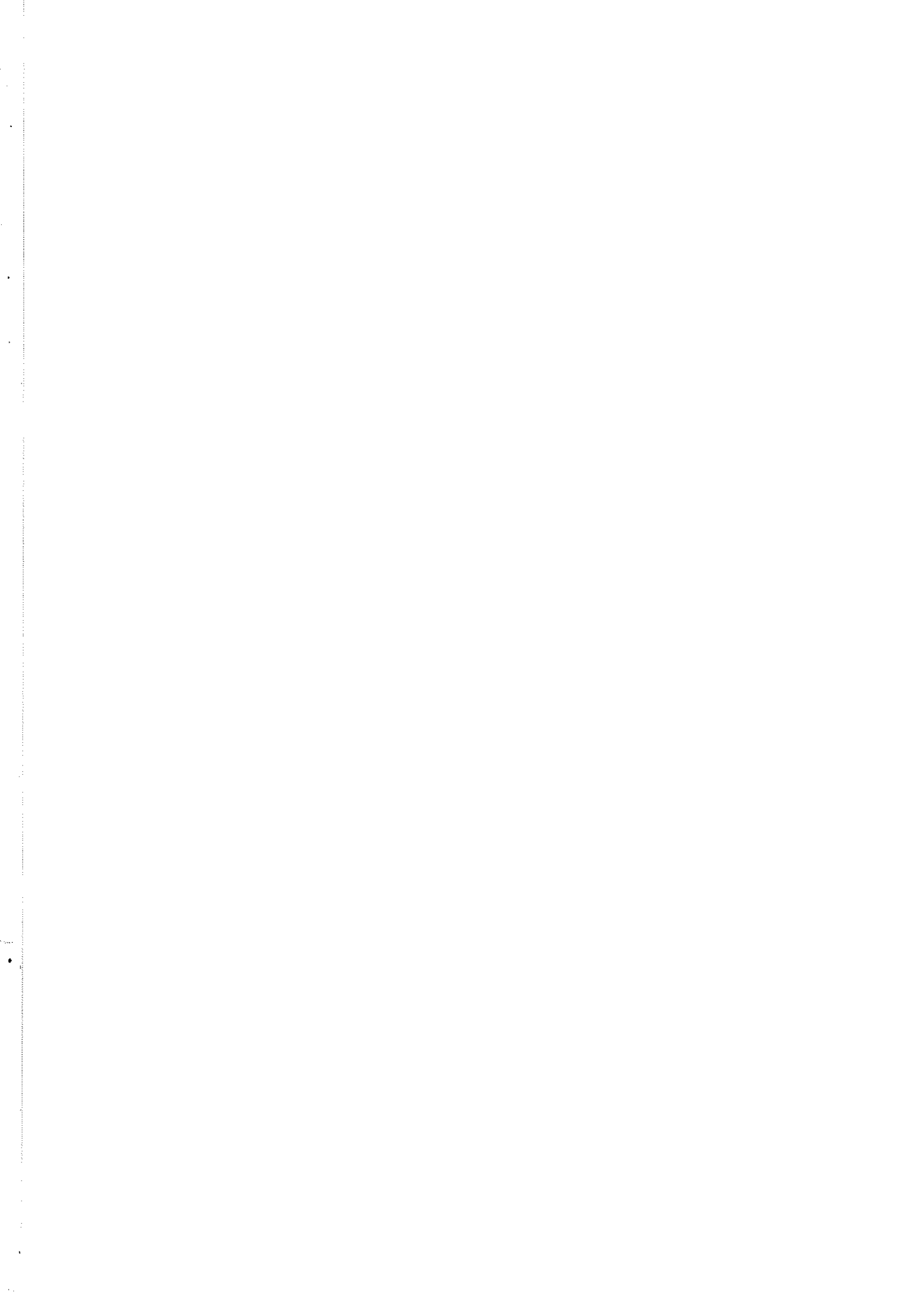
Les cellules de tabac souche BY2 sont fournies par le Dr D. Tremoussague (INRA, Toulouse France).

### **2. Solvants, enzymes et produits chimiques :**

Les solvants utilisés, acétone, acétonitrile, dichlorométhane, éthanol et méthanol sont de qualité analytique et proviennent de la société Scharlau Chemie S.A. (Barcelone, Espagne). L'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide formique et le toluène sont de qualité analytique et proviennent de la société Prolabo. Le diméthylchlorosilane (DMCS) provient de la société Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

L'eau utilisée en chromatographie liquide haute performance (CLHP) est de l'eau ultrapure obtenue sur système MilliQ (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Le phosphate de potassium, la  $\beta$ -glucosidase d'amandes et l'estérase de foie de lapin proviennent de la société Sigma Aldrich.





### **3. Nonylphénol (NP) radiomarké et non radiomarké :**

Le nonylphénol (NP) non radiomarké provient de la société Fluka. C'est en fait un mélange de plusieurs isomères ; de position *ortho* et *para* de la chaîne alkyle sur le cycle phénolique et/ou de linéarité de la chaîne alkyle.

Le [U-<sup>14</sup>C-ring]-4-*n*-NP marqué provient de l'A.R.C. (American Radio-labeled Chemical, USA). Il s'agit de l'isomère linéaire en position *para*. Son activité spécifique est de 40 mCi/mme avec une radiopureté supérieure à 95%.

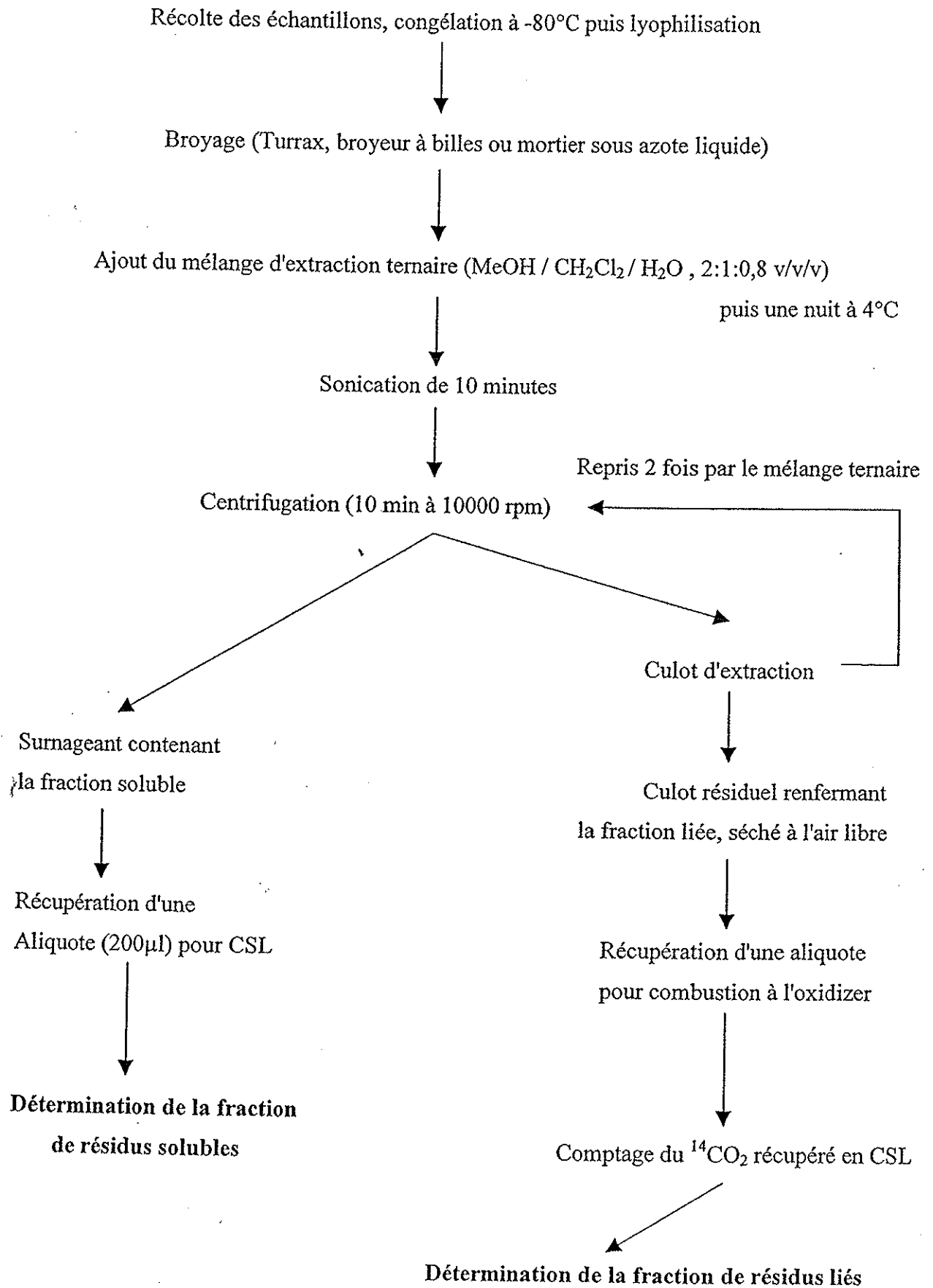
### **4. Matériel :**

Toutes les expérimentations ont été réalisées avec de la verrerie silanisée afin de minimiser les problèmes liés à la forte adsorption du NP aux parois des récipients. Pour cela, un mélange de DMCS/toluène (5 :95 ; v/v) a été appliqué sur la verrerie. Pour les mêmes raisons, des cônes pour micropipettes en silicone, de type *Low-Binding* (VWR international S.A.S., Toulouse, France) ont été utilisés.

#### **4.1 Chromatographie liquide :**

L'analyse des métabolites du NP a été effectuée par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité en ligne (Radio-CLHP) sur une chaîne de type Hewlett Packard Série 1100 (Evry, France) équipée d'un four réglé à 25°C et d'un dégazeur. L'injecteur est de type Rhéodyne 7725i avec une boucle de 500µl. La colonne utilisée est de type C18 ProntoSil 5 µm (BISHOFF, I.C.S., Lapeyrouse-Fossat, France), de dimensions 250 mm x 4,6 mm, protégée par une précolonne de garde de type C18 Kromasil (18 mm x 4,6 mm). Le détecteur de radioactivité en ligne est un Flo-one Beta A-500 (Packard, volume de la cellule : 0.5 ml ; 2 mL de liquide scintillant/ 1 mL d'effluent). Pour la purification des métabolites, la chaîne CLHP a été couplée à un collecteur de fractions (Gilson, modèle FC 202 ; Gilson France, Villiers le Bel, France).

**Figure 20** : Schéma du protocole de traitement des plantes.



#### 4.2 Comptage de la radioactivité :

La radioactivité contenue dans les plantes et les résidus liés est déterminée après combustion des échantillon à l'aide d'un oxidizer (model 307, Packard Bioscience Company, Downers Grove, IL, USA). Le [<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub> émis est absorbé par un mélange de liquides scintillants (Permafluor et Carbo-Sorb, (7/10, v/v) Perkin-Elmer Life Sciences, Villebon-sur-Yvette, France), suivi d'un comptage en scintillation liquide sur compteur de type Tricarb 2200 CA (Packard).

La radioactivité présente dans les échantillons liquides a été déterminée par comptage d'aliquote en scintillation liquide sur des compteurs de type Tricarb 2200 CA (Packard). Le liquide scintillant utilisé est de l'Ultimagold (Packard).

## **II. Méthodes analytiques:**

### **1. Méthodes extractives :**

Après récolte, les plantes sont lyophilisées puis broyées soit au broyeur à billes, soit au mortier sous azote liquide, ceci en fonction de la masse de l'échantillon. Une aliquote du broyat est prélevée afin de déterminer la radioactivité totale absorbée par la plante. 4 ml de solvant d'extraction ternaire, dichlorométhane/méthanol/eau (1 :2 :0.8 ; v/v/v) sont ajoutés par gramme de tissu broyé restant. Après homogénéisation au vortex, les échantillons sont conservés une nuit à 4 °C.

Les broyats sont ensuite traités pendant 10 min par sonication à l'aide d'un appareil de type Sonifier II, W-450 (Branson) puis centrifugés à 10000g pendant 10 min à 5 °C (centrifugeuse modèles Sigma 3 MK, Bioblock). Les culots sont lavés 2 fois selon le même protocole. Les trois surnageants qui contiennent les résidus extractibles sont combinés et une aliquote est prélevée pour la détermination de radioactivité.

**Figure 21 :** Protocole d'utilisation des cartouches C<sub>18</sub>.

**Activation :** 1 volume de méthanol

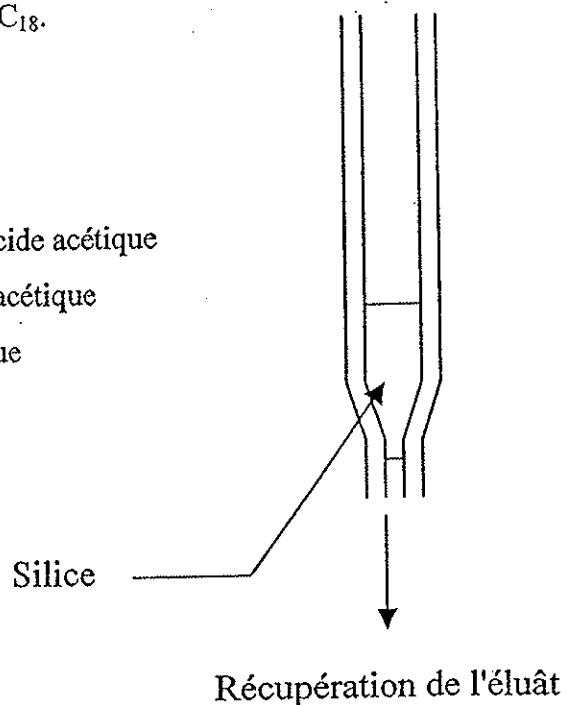
**Conditionnement :** 1 volume de H<sub>2</sub>O à 0,1% d'acide acétique

**Dépôt :** dépôt de l'extrait acidifié à 0,1% d'acide acétique

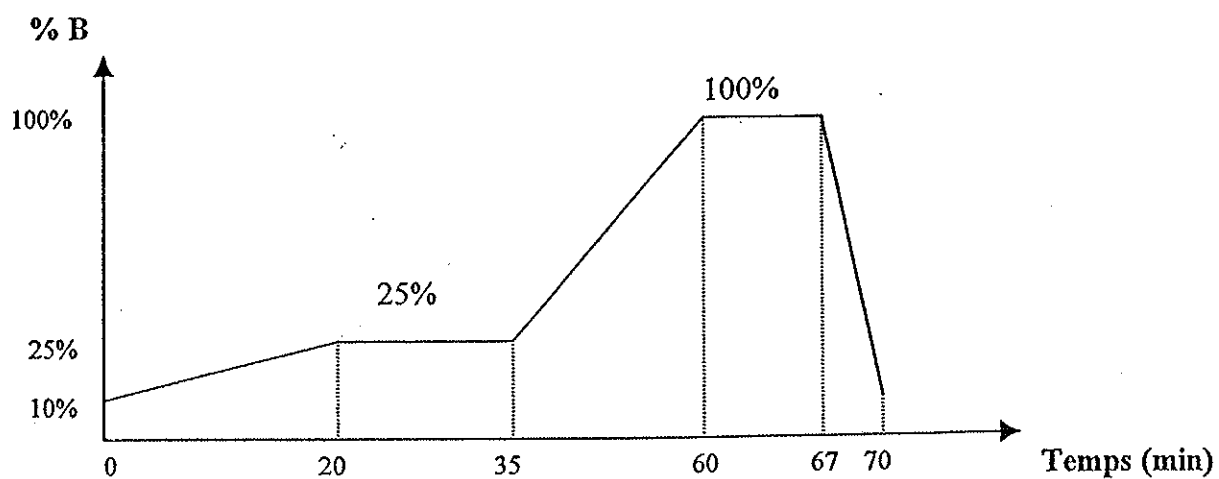
**Lavage :** 1 volume de H<sub>2</sub>O à 0,1% d'acide acétique

**Séchage :** sous flux d'azote

**Elution :** 2 volumes d'acétonitrile



**Figure 22 :** Représentation du gradient CHLP utilisé pour l'analyse et la purification des métabolites.



Les cellules de tabac sont récoltées et filtrées sous vide sur verre fritté pourvu d'un filtre Whatman (Multigrade GMF 150, 2  $\mu\text{m}$ , 47 mm de diamètre) puis stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Une aliquote du filtrat et une aliquote des cellules sont prélevées déterminer la radioactivité.

Les parois des erlens de culture ainsi que celle des erlens ayant reçu le filtrat sont rincées par une quantité connue de méthanol, une aliquote prélevée puis comptée en CSL, les filtres sont eux aussi récupérés pour CSL ; ceci afin de déterminer les pertes de radioactivité liées à l'adsorption du NP sur les parois des différents contenants. Les cellules sont broyées avec un broyeur type Turrax (IKA®-Ultra-Turrax T25, Bioblock Scientific) puis lyophilisées. Elles sont soumises aux mêmes conditions d'extractions que les plantes entières puis centrifugées à 2500g.

## **2. Méthodes séparatives :**

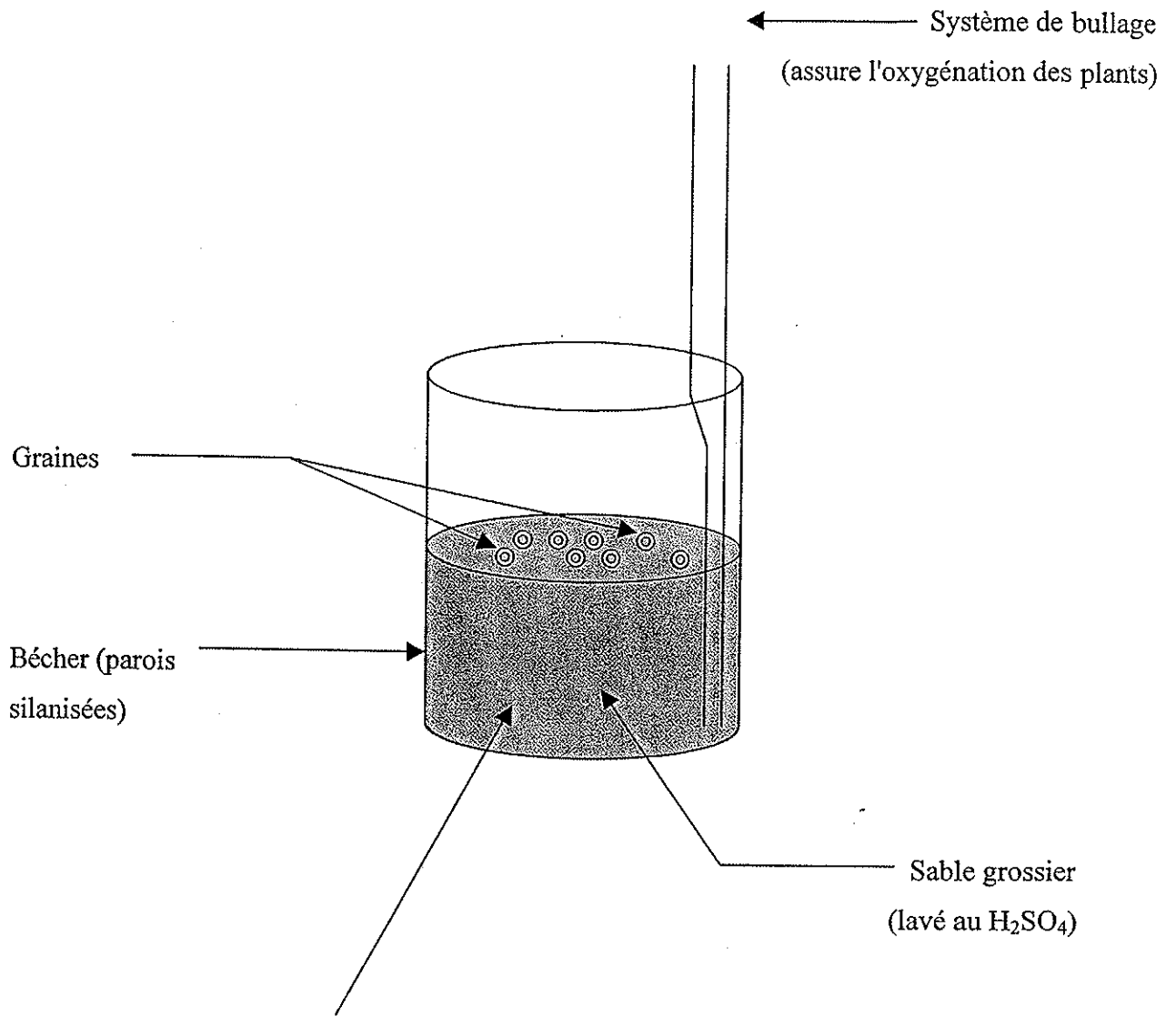
Les extraits ont été concentrés par séchage sous flux d'azote puis purifiés sur cartouches de type Chromabond C18, 1 g (Macherey Nagel, Hoerd, Düren), selon le protocole décrit figure 21. L'extrait purifié est concentré sous flux d'azote et centrifugé 5 min à 7000g. Avant l'analyse par CLHP, l'extrait concentré est repris par la phase mobile appropriée avant d'être analysé en Radio-CLHP (mélange A :  $\text{H}_2\text{O}$  à 0.1% d'acide acétique,  $\text{pH} = 2.4$ , mélange B : acétonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$ /acide acétique 0,1% (90 :10, v/v) à un débit de 1 ml/min et une température de  $25^{\circ}\text{C}$  selon le gradient de la figure 22. La durée de chaque analyse est de 70 minutes.

## **3. Hydolyses enzymatiques et chimiques :**

Des aliquotes contenant environ 150 000 dpm, sont évaporés à sec sous azote avant le traitement par les enzymes ou l'HCl.

- *Hydrolyse acide* : Les échantillons sont dissous dans 200  $\mu\text{l}$  d'HCl 2N et incubés dans des flacons bouchés 1 h à  $100^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité.

**Figure 23 :** Schéma de mise en place des cultures hydroponiques.



Solution de Hoagland (130 ml) à 6 mg/l de NP  
contaminée par 10 ou 20  $\mu\text{Ci}$  de [<sup>14</sup>C]-n-NP

- *Hydrolyse acide* : Les échantillons sont dissous dans 200 µl d'HCl 2N et incubés dans des flacons bouchés 1 h à 100 °C à l'obscurité.
- *Hydrolyse par la β-glucosidase d'amandes* : les échantillons sont incubés 2 h à 30 °C avec 2 unités d'enzyme dissout dans 200 µl de tampon acétate de sodium 0.1 M, pH = 5.
- *Hydrolyse par l'estérase de foie de lapin* : les échantillons sont incubés 10 min à 30 °C avec 2 unités d'estérase dans 200 µl de tampon phosphate de potassium 0.05 M, pH = 7,5.

Les hydrolysats enzymatiques sont analysés directement en radio-CLHP après ajout d'acétonitrile (5% final). Les hydrolysats acides sont séchés sous azote puis repris par la phase mobile appropriée avant d'être analysés par radio-CLHP. Des témoins ont été réalisés dans le cas des hydrolyses enzymatiques.

### **III. Protocoles expérimentaux :**

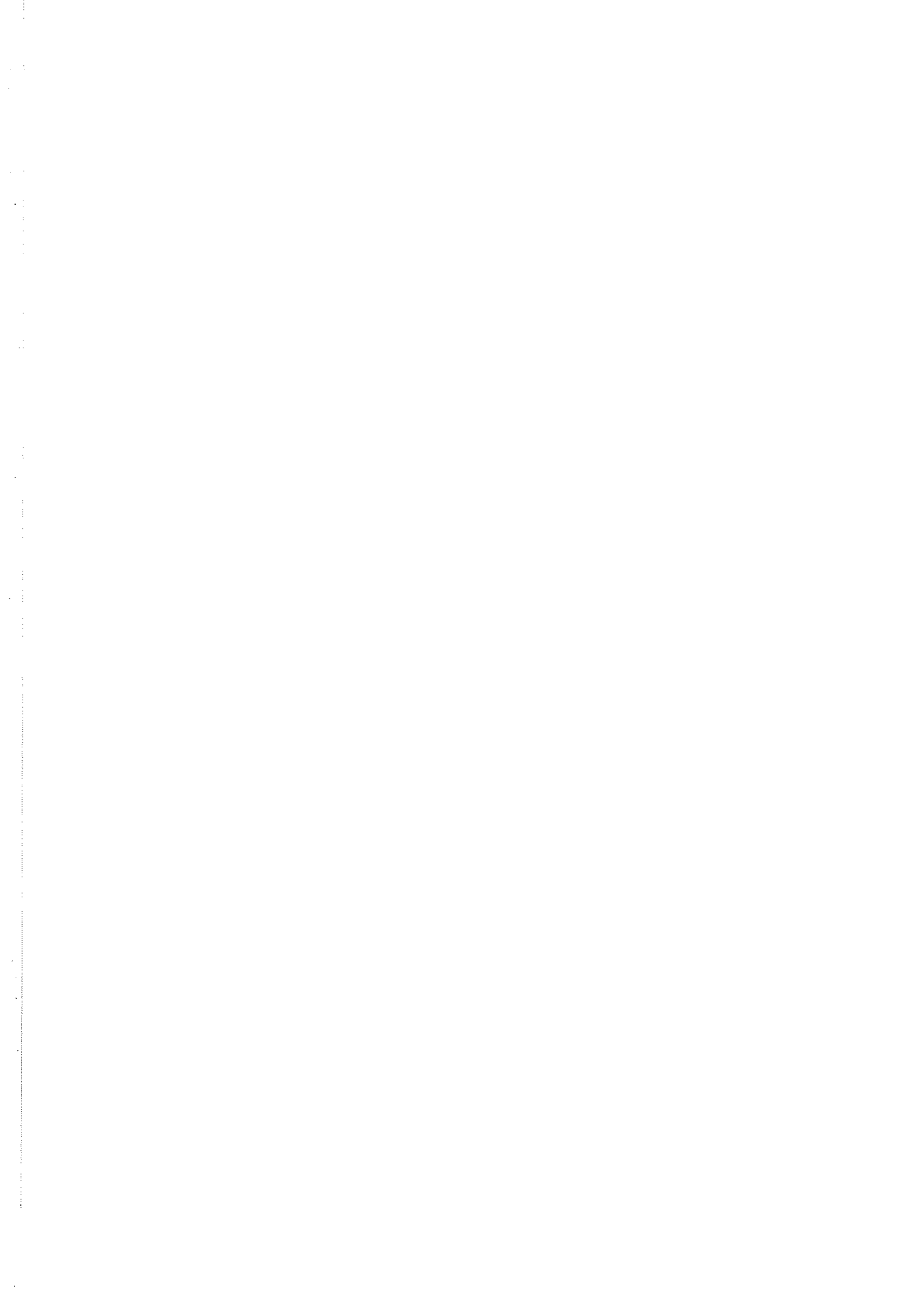
#### **1. Absorption et distribution du NP dans les plantes :**

##### *1.1 Cultures hydroponiques :*

Dix graines de chaque plante étudiée ont été semées dans des béciers aux parois silanisées de 600 ml, remplis de sable préalablement lavé à l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N. Les béciers ont été équipés d'un système d'aération par bullage. Les expériences sont réalisées en duplicat. Les semis ont ensuite été arrosés par 230 ml d'une solution de Hoagland (Sigma-Aldrich) contenant 6 mg/l de NP. Selon les essais, 370 ou 720 kBq de NP radiomarqué par bécier sont ajoutés dans la solution d'arrosage.

Au bout d'une période d'un mois, les plantes sont récoltées, les feuilles et les racines sont séparées et pesées (poids frais). Ces dernières sont lavées à l'eau. Les feuilles et racines sont ensuite conservées à - 80 °C avant d'être lyophilisées et pesées (détermination du poids sec). La répartition des résidus de [<sup>14</sup>C]-4-*n*-NP entre résidus solubles (extractibles) et liés (non extractibles) est ensuite déterminée.





## *1.2 Cultures sur sol reconstitué :*

Les expériences sont réalisées sur un sol reconstitué composé d'un mélange de terre (37%), de sable grossier n° 30 (37%) et de sable fin n°36 (26%). Dans un premier temps, deux cultures de blé ont été réalisées dans des béciers de 1 l aux parois silanisées ; 10 graines ont été semées par bécier dans environ 700 g de sol reconstitué. Le sol est préalablement contaminé par 140 ml de solution de NP (6 mg/l, 925 kBq/bécier) afin d'obtenir un taux d'humidité de 40%. L'apport [<sup>14</sup>C]-4-n-NP se fait par dilution d'une solution éthanolique de ce composé dans la solution mère de NP froid. L'apport d'éthanol final dans le milieu est inférieur à 0,1%.

Deux autres essais ont été réalisés sur le blé dans un volume de sol de 1.5 kg dans lequel ont été semées un nombre plus important de graines (environ 200) et contaminé par un apport de 1,48 MBq de <sup>14</sup>C-4-n-NP (les autres paramètres, humidité et concentration de NP froid restant identiques). Enfin, un essai sur le radis a été réalisé dans les mêmes conditions que l'essai précédent.

## *1.3 Etudes cinétiques de transfert du NP vers la plante :*

### 1.3.1 Transfert chez le blé :

3.5 kg de sol a été préparé puis humidifié par un apport de 830 ml de solution de NP (6 mg/l) contenant 1,48 MBq de [<sup>14</sup>C]-4-n-NP. Après homogénéisation, le sol a été reparti dans 24 béciers silanisés d'une contenance de 200 ml. 20 graines ont été semées par bécier. Ensuite, 3 béciers ont été récoltés toutes les semaines.

### 1.3.2 Transfert chez le radis :

Cent graines de radis ont été semées dans 1.5 kg de sol, humidifié par l'apport de 300 ml d'une solution de NP (6 mg/l) contenant 1,48 MBq de [<sup>14</sup>C]-4-n-NP. Aux temps J7, J14, J21 et J28, 3 lots de plantes ont été récoltés soit 12 lots au total.

**NB :** Les essais ci-dessus ont été réalisés en armoire climatisée, en cycle alternance jour / nuit 16h / 8h, 25°C / 20°C.



#### *1.4 Amendement des sols par des boues de STEP :*

Des expériences sur sol amendé par des boues de STEP ou non amendé ont été réalisées. Les sols sont de même composition que précédemment. Les boues en provenance de la station d'épuration de Labège (Haute-Garonne) ont été gracieusement fournies par SEDE-Environnement (Toulouse). Ces boues sont des boues inactivées à 20% de matières sèches. La concentration finale en boues est de 6% en matière sèche. Des cultures de blé, de radis et d'épinard ont été réalisées pour des durées de 15 j et 1 mois.

La concentration finale en NP (35 kBq/mg) est de 6 mg/kg de sol. Les pots en terre utilisés contiennent 440 g de sol pour les expériences de courtes durées ; ceux utilisés pour les expérimentations de 1 mois contiennent 1320 g de sol. Les plantes sont cultivées en conditions extérieures.

La paroi des pots est maintenue humide afin d'éviter des phénomènes de convection de l'eau et des substances dissoutes depuis le sol vers les parois du pot ; 10 g de graines de blé ou 30 graines de radis ont été semées par pot.

## **2. Détermination du métabolisme :**

### **2.1 Cultures de cellules de tabac :**

Les cellules sont cultivées dans 200 ml de milieu MB1, dans des erlenmeyers de 1 l, à l'obscurité à 25 °C sur agitateur rotatif (140 rpm). Après une phase de croissance de 5 jours, les cellules sont contaminées par une solution de NP (6 mg/l, 74 kBq).

### **2.2 Feuilles excisées de blé :**

Afin d'étudier le métabolisme du NP dans les feuilles de blé, une étude sur feuilles excisées a été réalisée. Sur des plants de blé âgés de 2 semaines, 5 feuilles ont été prélevées et coupées au ras de la tige. La base des feuilles est ensuite plongée dans 2 ml de solution de 74 kBq de [<sup>14</sup>C]-4-n-NP pur. Après absorption de la solution, 2 ml d'eau sont rajoutés. Les feuilles sont récoltées 48 h après.

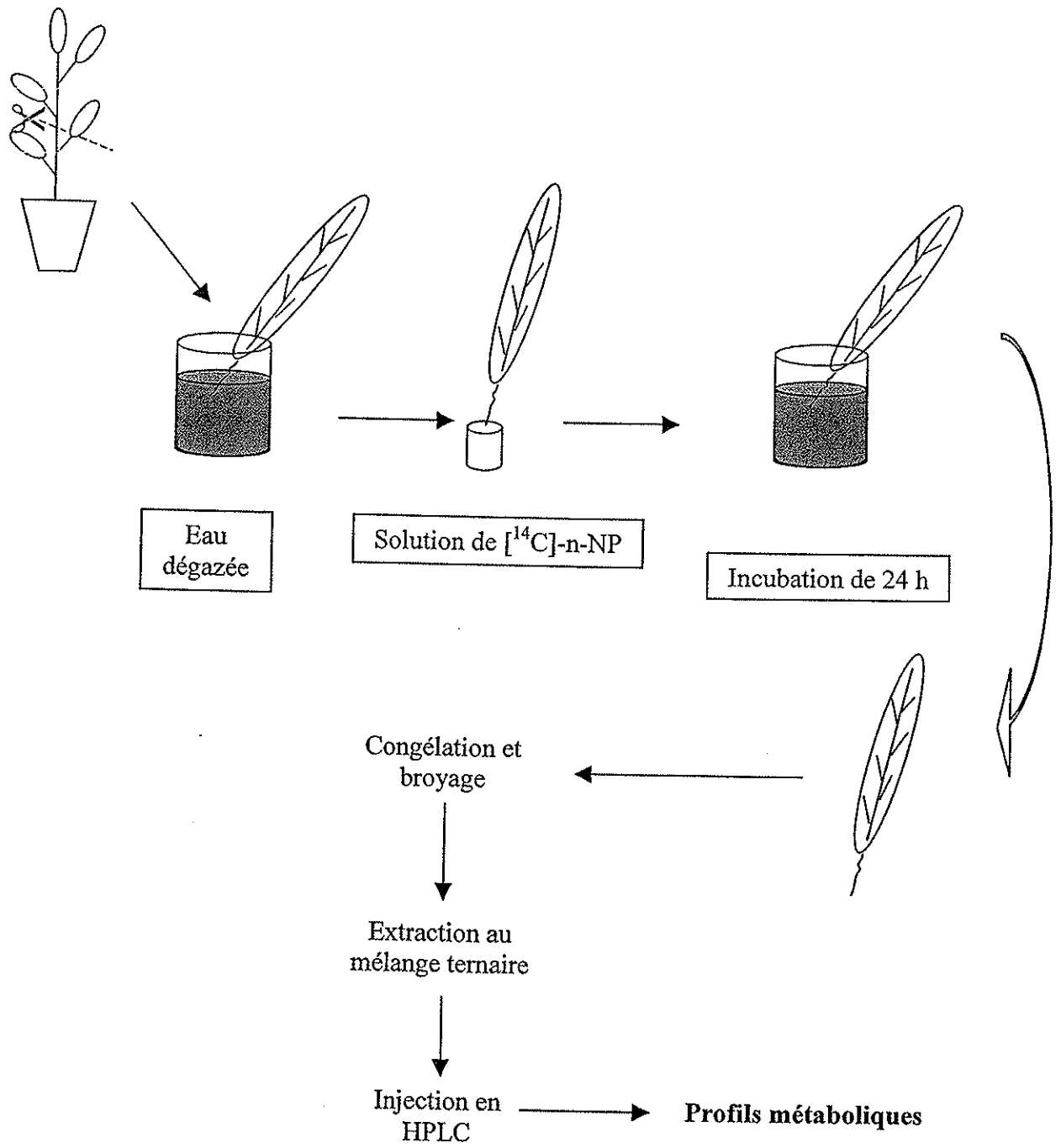
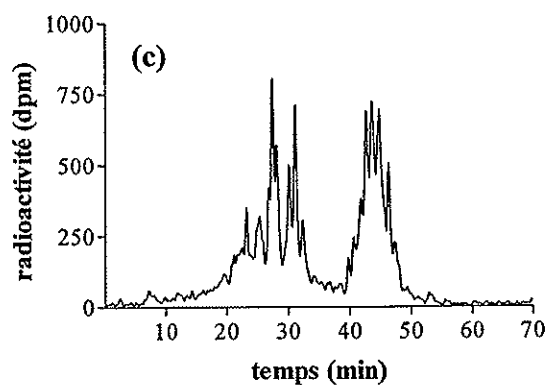
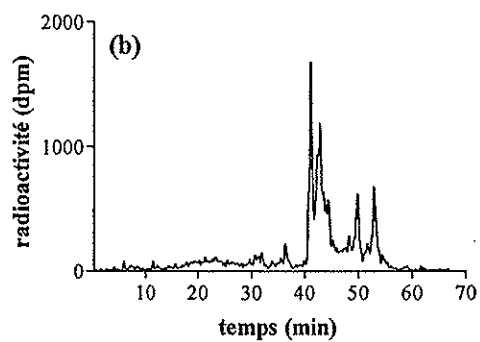
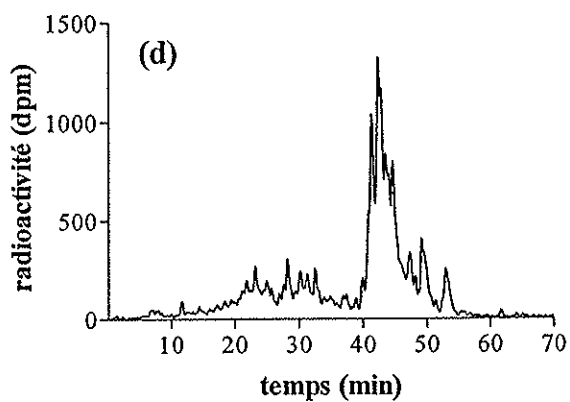
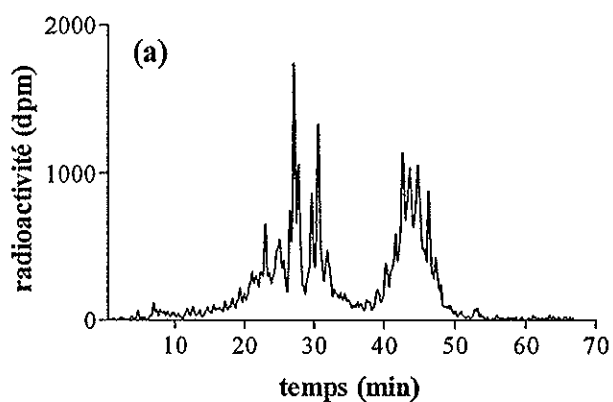


Figure 24 : Schéma du protocole de traitement des feuilles excisées.

### 2.3 Contamination directe de plants par du nonylphénol :

Des plants ayant poussé pendant un mois en terre non contaminée ont été soigneusement prélevés afin de préserver au maximum l'intégrité du système racinaire puis leurs racines trempées dans une solution constituée de 45% d'acétone, 45% d'eau, 20% de Tween 1% et renfermant une concentration de 60mg/l de NP (60 kBq/mg de [<sup>14</sup>C-NP]). Les plants sont pesés avant et après trempage afin de connaître la masse approximative de solution déposée. Après évaporation de l'acétone, les plants sont replantés séparément dans de la terre non contaminée puis cultivés pendant un mois avant d'être récoltés.



**Figure 25 :** Profils métaboliques de radio-CLHP de la métabolisation du [14C]-4-*n*-NP dans des cellules de tabac. (a) : extrait brut ; (b) : après hydrolyse acide ; (c) : après hydrolyse à l'estérase ; (d) : après hydrolyse à la  $\beta$ -glucosidase.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **I. ETUDES DE METABOLISME DU NP :**

### **1. Métabolisme du NP dans les cellules de tabac :**

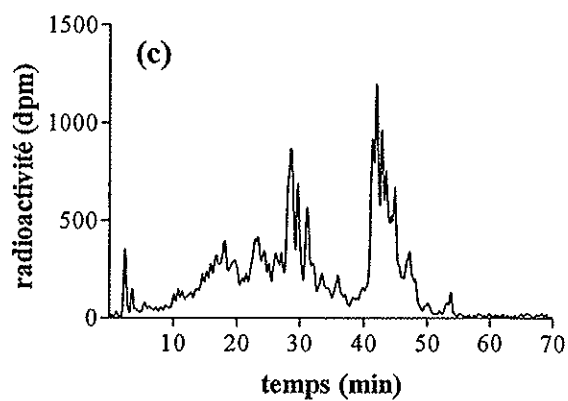
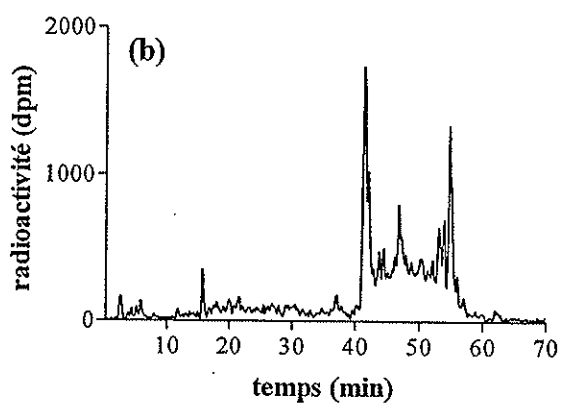
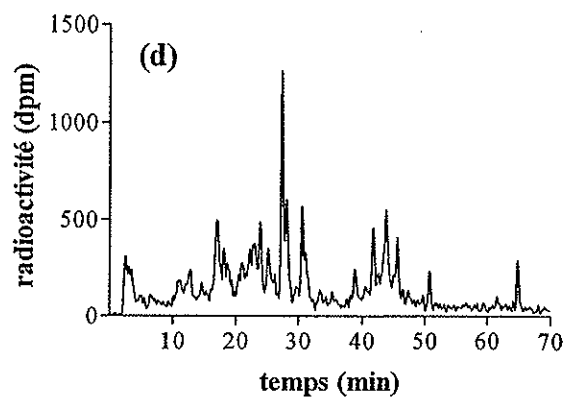
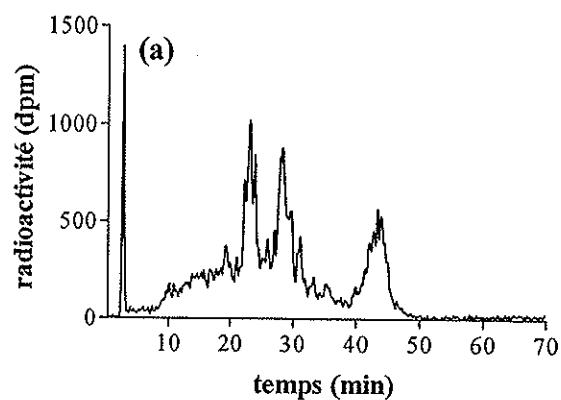
Les études de métabolisme sur les cellules de tabac ont été mises en place pour servir de modèle dans l'identification des métabolites du NP sur plantes entières. L'identification de ces derniers par spectrométrie de masse (SM) n'a pu être réalisée dans les délais de l'expérimentation, il nous est donc impossible de présenter ici la structure des métabolites purifiés. Ceci n'est pas préjudiciable dans la mesure où il n'a pas été possible de réaliser les analyses sur plantes entières car les quantités de radioactivité récupérées étaient trop faibles et les métabolites piégés par la chlorophylle au moment de la concentration des échantillons.

L'analyse CLHP d'extraits cellulaires de tabac après 120 h permet la détection d'une quinzaine de pics répartis en deux massifs principaux (figure 25a), un premier, relativement polaire, avec des temps de rétention compris entre 20 et 32 min ; le second avec des temps de rétention compris entre 40 et 48 min. A ce temps d'incubation, [<sup>14</sup>C]-4-*n*-NP (tr de 65 min) a été totalement métabolisé.

Dans nos conditions chromatographiques, il n'a pas été possible d'obtenir une résolution suffisante pour séparer chacun des pics constituant ces deux massifs ; probablement à cause du grand nombre de métabolites issus de la dégradation de la chaîne alkyle du 4-*n*-NP. L'observation d'un tel comportement chromatographique est classique avec ce composé.

L'hydrolyse acide (figure 25b) montre un déplacement du massif 1 vers le massif 2 ainsi que l'apparition de deux nouveaux pics à 50 et 53 min. Le massif 1 semble donc renfermer des composés conjugués des métabolites composant le massif 2 (métabolite dérivés





**Figure 26** : Profils métaboliques de radio-CLHP de la métabolisation du [14C]-4-*n*-NP dans des feuilles excisées de blé. (a) : extrait brut ; (b) : après hydrolyse acide ; (c) : après hydrolyse à  $\beta$ -glucosidase. (d) correspond au profil obtenu à partir d'un extrait brut de racines de radis.

du NP). Ce dernier massif représente vraisemblablement (au regard des travaux précédemment effectués au laboratoire) des métabolites hydroxylés du NP. Ces résultats rejoignent ceux obtenus jusqu'à ce jour sur la métabolisation du NP. Dans le deuxième massif, l'hydrolyse entraîne l'apparition de 2 pics au niveau de ce massif (tr de 50 min et 53 min).

L'hydrolyse par l'estérase ne modifie pas le radiochromatogramme (figure 25c), ce qui suggère l'absence de métabolites conjugués avec une liaison ester.

L'hydrolyse par la  $\beta$ -glucosidase (figure 25d) montre un déplacement de la quasi totalité du premier massif vers le second, ce qui permet de penser que les métabolites conjugués le sont principalement à du glucose. Comme dans le cas de l'hydrolyse acide, on note l'apparition de 2 pics à 50 et 53 min.

## **2. Métabolisme du NP dans les feuilles de blé excisées :**

Le radiochromatogramme obtenu après injection des extraits bruts (figure 26a) est sensiblement identique à celui obtenu sur les cellules de tabac avec un massif de composés conjugués, (subdivisible en 2 parties) et un massif de composés hydroxylés. Le pic à 3 minutes ne correspond pas à un métabolite, il s'agit d'un artefact apparaissant ou non en fonction des injections.

L'hydrolyse acide (figure 26b) donne le même type de résultat que précédemment ; le massif 2 pourrait correspondre là aussi à des métabolites conjugués du NP.

L'hydrolyse par la  $\beta$ -glucosidase (figure 26c) montre un déplacement du massif tr = 22-25 min vers le groupe des composés hydroxylés. Ce massif correspond donc à des métabolites conjugués au glucose, le massif tr = 26-30 min doit correspondre à des métabolites conjugués à d'autres molécules, peut être des malonates. L'analyse en spectrométrie de masse des pics purifiés permettra l'identification précise de ces métabolites.



### **3. Métabolisme du NP dans la racine de radis :**

La figure 26d correspond à l'analyse CLHP de l'extrait obtenu à partir de radis contaminés par application directe d'une solution de [<sup>14</sup>C]-4-*n*-NP sur des radis âgés d'un mois puis replantés pour un période d'un mois. Les résultats obtenus montrent *a priori* une métabolisation du NP et un stockage de ses métabolites sous forme hydroxylée et conjuguée. Au bout d'un mois, il reste une très faible proportion de NP non métabolisé ; ce dernier est caractérisé par le pic  $t_r = 65$  min.

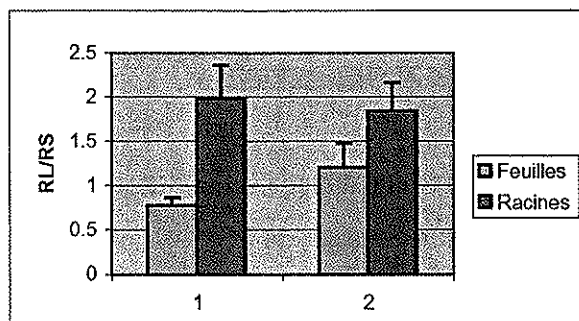
Bien que les racines aient été lavées avant broyage et extraction, on ne peut exclure que ce pic soit lié à la présence de NP adsorbés sur la cuticule de la racine. Il faut donc effectuer de nouvelles analyses en différenciant les différents tissus racinaires afin de déterminer comment le NP est absorbé et stocké dans la racine.

## **II. ABSORPTION DU NP PAR LES PLANTES :**

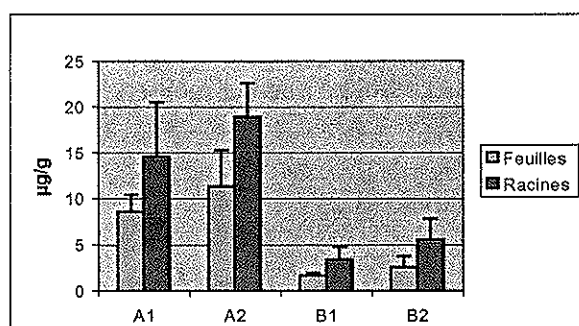
### **1. Essais sur les hydroponiques de radis :**

Deux séries d'essais ont été réalisées dans les mêmes conditions culturales. Il ressort de ces essais que la radioactivité s'accumule préférentiellement au niveau de la racine, mais qu'environ 30% à 40% de la radioactivité absorbée est transférée vers les parties aériennes. Bien que les écarts types soient très importants, on constate que la répartition des composés entre feuille et racine est la même dans tous les essais (figure 27). On note cependant une forte différence dans les quantités de produit absorbé par gramme de tissu sec, près de trois fois plus importante dans les lots du premier essai (essais A1 et A2) ; aucune hypothèse concernant ce résultat n'est envisagée pour le moment.

La répartition des résidus entre forme liée (fixée aux parois cellulaires) et soluble (stockée dans la vacuole) montre une quantité de composés présents sous forme liée plus importante dans les racines que dans les feuilles (figure 28).



**Figure 27 : Rapport entre les quantités de résidus liés et solubles dans les feuilles et les racines de radis âgés de 1 mois, cultivés en conditions hydroponiques. (moyenne ; et, n=10 ; 2 lots).**



**Figure 28 : Concentrations tissulaires de NP dans des feuilles et des racines de radis âgés de un mois, cultivés en conditions hydroponiques. Essais A et B réalisés successivement (moyenne ; et, n=10).**

Plant de Blé		Pourcentage moyen d'absorption du NP	Quantité totale de NP, µg	Concentration de NP, µg/g
Blé 1	Feuilles	0,13%	1,8	<b>0,26 ± 0,11</b>
	Racines	0,45%	6,21	<b>0,89 ± 0,18</b>
Blé 2	Feuilles	0,17%	2,3	<b>0,2 ± 0,07</b>
	Racines	0,49%	6,76	<b>4,2 ± 0,21</b>

**Tableau 13 : Concentrations de NP dans des plants de blé âgés de 1 mois, cultivés en conditions hydroponiques. Pourcentage de NP absorbé par rapport à la quantité initiale introduite, quantité en µg d'équivalent NP retrouvé dans la plante, concentrations en µg d'équivalent NP par gramme de tissu sec (moyenne ; et, n=10).**

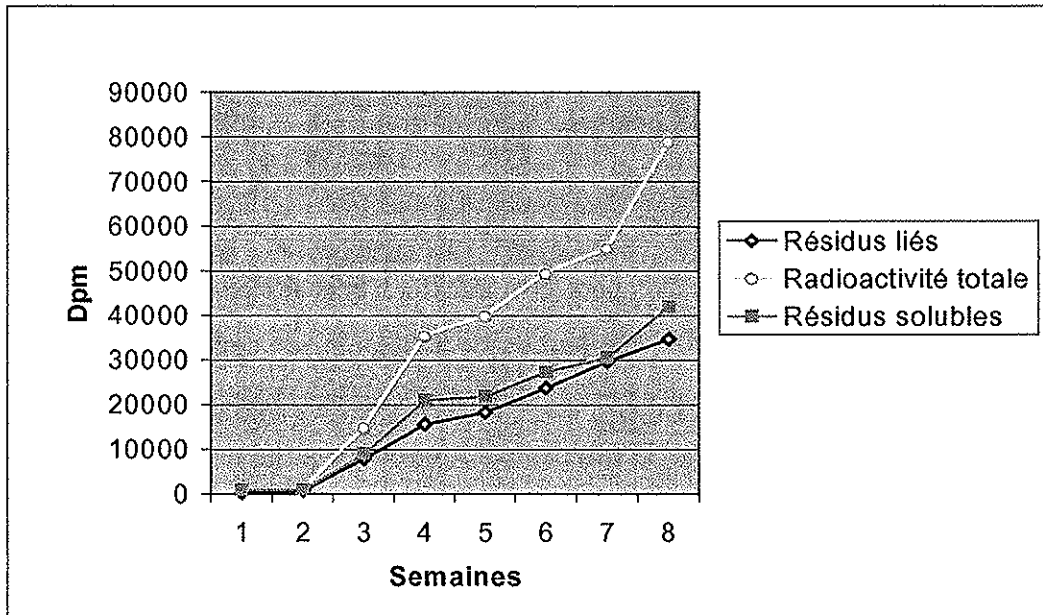
Ces cultures en hydroponique montrent l'existence d'une absorption du NP par le radis même si celle-ci est faible, de l'ordre de 1% de la quantité présente dans le sol et font état de concentrations de l'ordre de quelques  $\mu\text{g/g}$  de tissu sec de NP accumulées dans la racine.

Une fois absorbé, le NP peut être transféré vers les parties aériennes. Il y a formation de résidus liés dans les deux parties de la plante, et cette formation est plus importante dans les racines. Une réserve est à prendre en compte : bien que les radis aient été lavés après récolte, la possibilité que la radioactivité retrouvée au niveau des racines soit en partie due à des résidus de NP ou de métabolites adsorbés sur la cuticule de la racine n'est pas à exclure ; les techniques de détection utilisées ici ne permettant pas de caractériser la part de radioactivité adsorbée.

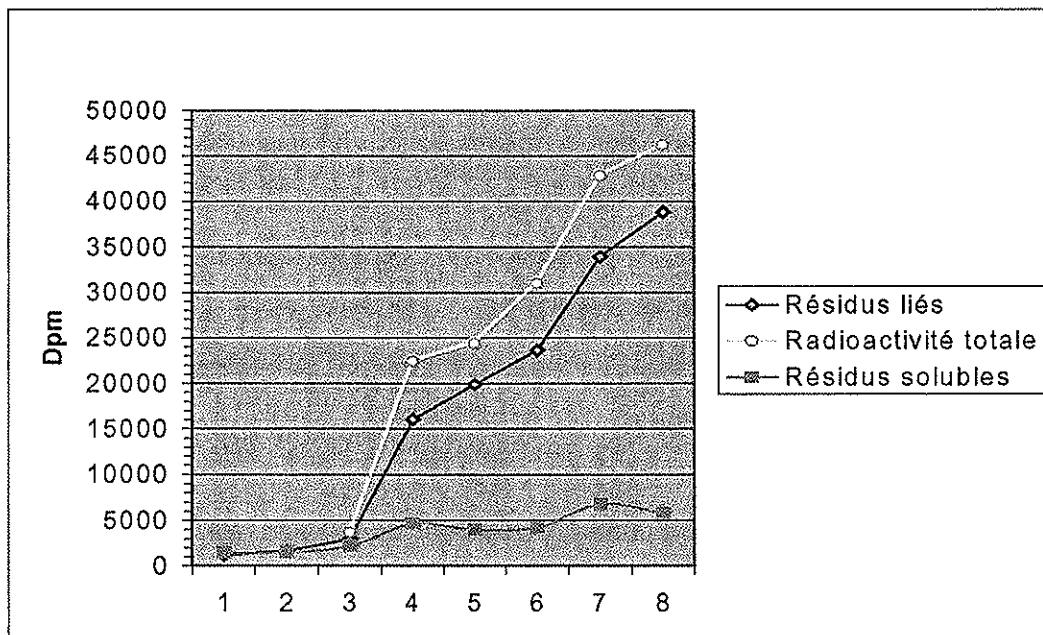
## **2. Cultures de blé en hydroponique :**

Les études réalisées en cultures hydroponiques sur des plantations de blé sont résumées par le tableau 14. Ces essais montrent une accumulation préférentielle de la radioactivité dans les racines. La radioactivité accumulée dans la feuille et les racines semble être fonction de leur poids respectif, avec une plus forte dispersion des valeurs dans les racines, ce qui pourrait suggérer qu'une partie de la radioactivité récupérée dans ces dernières provient de résidus adsorbés sur la cuticule. La proportion de résidus solubles et de résidus liés n'a pas été étudiée dans ces essais, cependant d'autres études (Pascal-Lorber *et al.*, 2003) ont montré la formation importante de résidus liés dans les racines et l'accumulation de résidus solubles dans les parties aériennes. Le pourcentage de NP absorbé par la plante est très faible dans nos conditions expérimentales.

Si ces essais en hydroponique permettent de montrer que les résidus de NP peuvent être absorbés par la plante puis qu'une partie est ensuite transférée vers les feuilles, ils ne peuvent être considérés comme représentatifs du comportement du NP dans des conditions environnementales, les phénomènes d'adsorption étant limités par rapport à ceux que l'on peut retrouver sur sol ; de même les mécanismes de dégradation du NP dans ce milieu liquide et homogène diffèrent sensiblement de ceux générés par les micro-organismes du sol.



**Figure 29 : Cinétique d'absorption du NP dans les feuilles de blé.** Evolution de la radioactivité en fonction du temps et évolution de la répartition des résidus sous forme liée ou soluble (moyenne, n=3).



**Figure 30 : Cinétique d'absorption du NP dans les racines de blé.** Evolution de la radioactivité en fonction du temps et évolution de la répartition des résidus sous forme liée ou soluble (moyenne, n=3).

### **3. Cinétique d'absorption chez le blé :**

La cinétique de transfert du NP dans des plants de blé montre une accumulation similaire de la radioactivité dans les parties racinaire et aérienne. L'accumulation de la radioactivité s'accroît au cours du temps (figures 29 et 30), toutefois la quantité absorbée comparée à la quantité introduite reste faible, seulement 5.5% environ (tableau 15) de la radioactivité de départ se retrouve dans les plantes au bout de 2 mois.

L'absorption reste faible pendant les trois premières semaines, puis augmente rapidement entre la troisième et la quatrième semaine. Cette faible absorption ne semble pas être liée au développement de la plante car la masse de ces dernières augmente de manière linéaire au cours du temps.

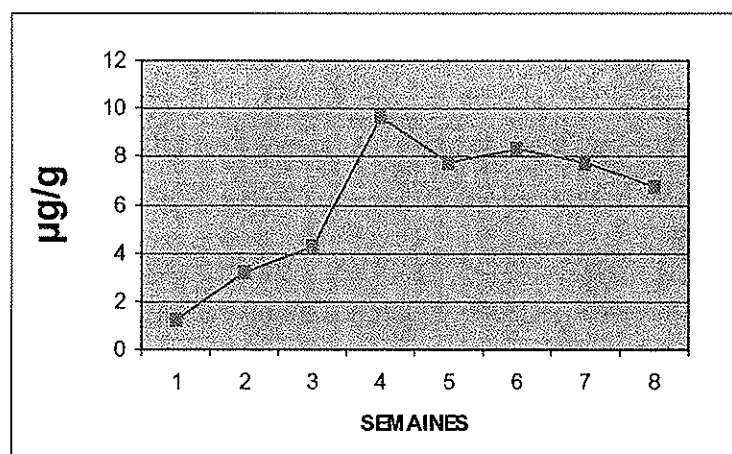
La concentration tissulaire dans les racines est faible (de l'ordre de 0,2  $\mu\text{g/g}$  de poids sec) les deux premières semaines puis augmente à partir de la troisième semaine jusqu'à la quatrième semaine pour se stabiliser autour d'une valeur de 9  $\mu\text{g/g}$  les semaines suivantes (figure 32). On observe la même période de latence au niveau des feuilles où la concentration tissulaire augmente à partir de la deuxième semaine pour se stabiliser à la quatrième semaine (figure 31) autour d'une valeur de 7  $\mu\text{g/g}$ . Dans les parties foliaires toujours, la radioactivité présente sous forme de résidus solubles est quasiment égale à celle présente sous forme de résidus liés. Dans les racines, le résultat est similaire à ceux obtenus avec les cultures hydroponiques, avec une très forte proportion de résidus liés, de l'ordre de 80%.

La radioactivité totale transférée est plus importante dans les feuilles que dans les racines. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus en culture hydroponique. Cela ne semble pas provenir d'une différence dans la croissance des plantes puisque le rapport masse des feuilles/masse des racines est voisin dans les deux types d'expérimentation. Par contre, ce résultat pourrait être rapproché de l'observation d'un temps de latence d'absorption dans les cultures sur sol. Dans la terre, le NP pourrait être dégradé par les micro-organismes du sol et ce seraient alors des résidus de dégradation plus assimilables qui seraient absorbés par la plante. D'où ce temps de latence qui correspondrait à la période de métabolisation du NP. Ces résidus, probablement plus polaires que la molécule parente pourraient aussi être

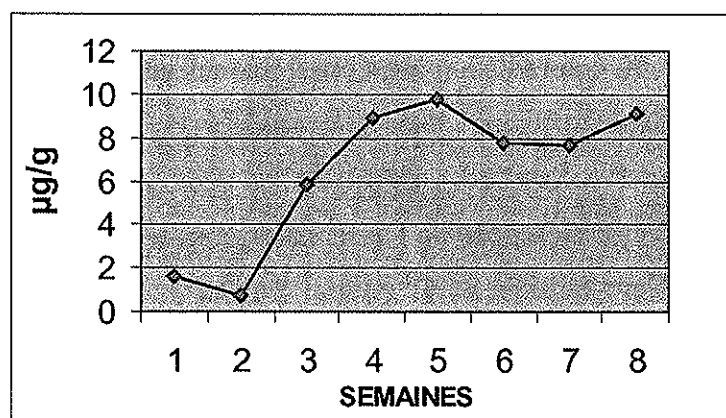


Semaine	1	2	3	4	5	6	7	8
Pourcentage de NP absorbé, %	0,16	0,22	0,81	2,53	2,82	3,52	4,28	5,46
Quantité de NP absorbé $\mu\text{g}$	0,32	0,44	1,62	5,06	5,84	7,04	8,56	10,92
Concentration de NP $\mu\text{g/g}$ de poids sec	0,6	0,93	2,25	4,18	4,2	3,65	3,5	3,67

**Tableau 15 : Accumulation du NP dans des plants de blé cultivé en terre.** Semis immédiatement après la contamination du sol par le NP. (Pourcentage de NP absorbé par rapport à la quantité initiale introduite ; quantité de NP absorbé par la plante en  $\mu\text{g}$  d'équivalent NP ; concentrations en  $\mu\text{g}$  d'équivalent NP par g de tissu sec, moyenne,  $n = 3$ ).



**Figure 31 : Evolution de la concentration de NP dans les feuilles de blé cultivé en terre en fonction du temps.** Concentration en  $\mu\text{g}$  d'équivalent NP par g de tissu sec (moyenne,  $n=3$ ).



**Figure 32 : Evolution de la concentration de NP dans les feuilles de blé cultivé en terre en fonction du temps.** Concentration en  $\mu\text{g}$  d'équivalent NP par g de tissu sec (moyenne,  $n=3$ ).

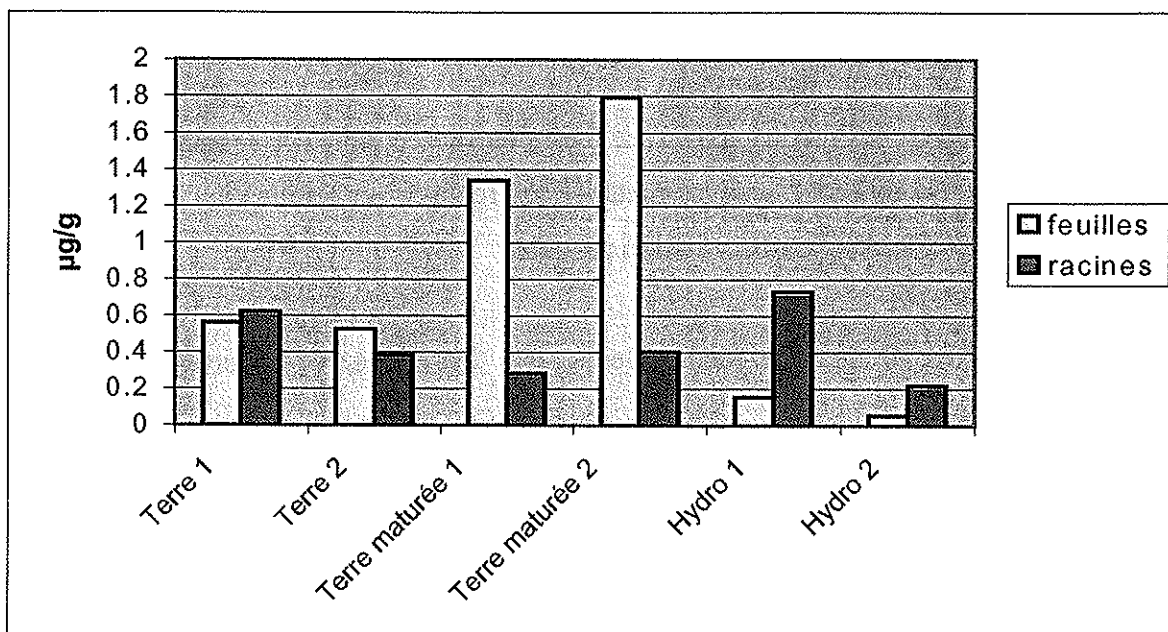
mieux transférés à l'intérieure de la plante. Le sol peut donc jouer donc un rôle important dans l'absorption du NP.

Le produit d'absorption s'accumule dans un premier temps dans la racine avant d'être transféré vers les parties aériennes, il est donc susceptible d'être métabolisé à ce niveau avant de gagner la feuille. L'analyse métabolique réalisée sur feuilles excisées ne permet pas de rendre compte de cette transformation probable.

La dispersion des valeurs que l'on observe pourrait provenir d'une homogénéisation incomplète de la terre et de la solution contenant le NP. Quoiqu'il en soit, ce même phénomène est observé dans les conditions environnementales : de par sa forte lipophilie, le NP s'adsorbe sur les particules de sol de manière aléatoire ; ainsi pour une même parcelle de terre, les concentrations de NP récupérées peuvent varier de manière sensible en fonction des endroits.

Les plants de blé ont été semés dans un faible volume de sol ; le développement des racines à donc assuré à la plante une couverture de l'ensemble du volume de terre disponible, ce qui n'aurait pas forcément été en cas de semis en plein champ, le taux d'absorption déterminé ici ne donne donc qu'un aperçu de celui que l'on pourrait retrouver dans des conditions naturelles. Malgré le relatif éloignement des conditions de cet essai et de celles que l'on pourrait trouver en plein champ, les résultats obtenus semblent cohérents et applicables à la réalité en ce qui concerne le transfert et l'accumulation des résidus du 4-*n*-NP et permettent d'évaluer le risque de contamination, sans pour autant préjuger du risque d'exposition. Les valeurs numériques obtenues concernant l'absorption sont donc sujettes à caution et pourraient être inférieures en plein champ.

En conclusion de cet essai, on peut dire que l'accumulation du NP est liée à la croissance de la plante puisque la concentration tissulaire reste constante après trois semaines. Une partie des composés est transférée vers les feuilles et ce transfert est proportionnel aux concentrations présentes dans les racines. Dans les racines, il y a une plus grande accumulation de résidus présents sous forme liée contrairement à la feuille où les concentrations résidus solubles/résidus liés sont équivalentes. Enfin, on observe une très faible absorption dans les premières semaines de culture qui augmente après trois semaines ; cette période de latence est observable dans tous les compartiments de la plante.



**Figure 33 : Concentrations de NP dans des plants de blé âgés de 1 mois cultivés sur des sols différents.** Semis immédiatement après la contamination (essais "Terre") ; semis 2 semaines après la contamination du sol (essais "Terre maturée") ; semis en conditions hydroponiques, semis immédiatement après la contamination de la solution nutritive (essais "Hydro"). (Moyenne, 2 lots par essai).

#### **4. Influence du sol sur l'absorption du NP chez le blé :**

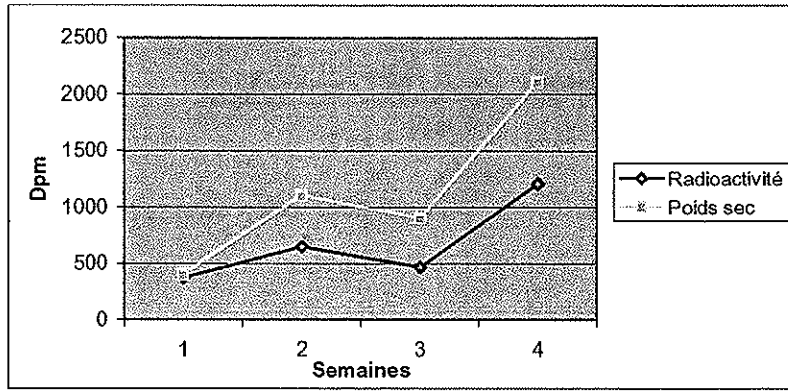
Trois sols différents ont été utilisés pour cette étude. Dans l'un des essais, les graines ont été semées immédiatement après contamination du sol (essais « terre » de la figure 33), dans le second essai, le sol contaminé a été laissé reposer 2 semaines avant de procéder au semis afin de vérifier l'influence d'une possible métabolisation dans le sol sur l'absorption du NP par la plante (essais « terre maturée »), enfin, les essais réalisés en hydroponique ont été pris en compte afin de servir de point de comparaison (essais « hydro », figure 33).

Dans tous ces essais, on constate le très faible transfert du NP vers la plante. La proportion de radioactivité liée atteint une valeur de 60% dans la feuille et de près de 85% dans la racine. Les résultats observés dans la figure 33 montrent que la répartition de la radioactivité diffère dans la plante selon le type de culture.

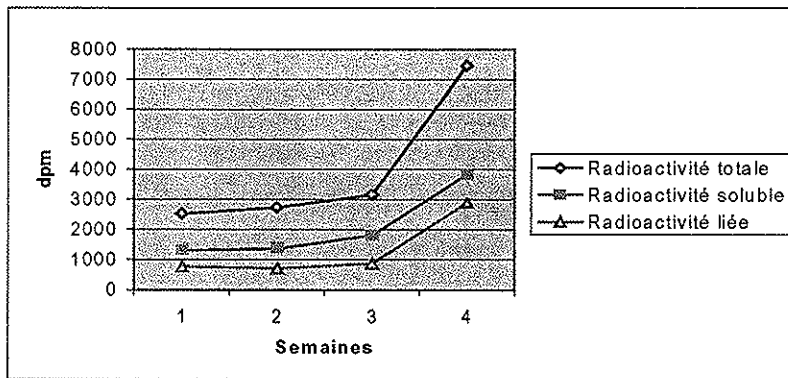
Dans les cultures hydroponiques, la majeure partie de la radioactivité est récupérée au niveau de la racine ; il est donc possible que dans ces essais, le phénomène d'adsorption au niveau des racines soit très important et que la radioactivité récupérée à ce niveau soit principalement liée à ce phénomène.

Par ailleurs, on observe des différences nettes entre les essais sur sol mûré et non mûré : sur sol mûré, un fort transfert des composés vers les parties aériennes est observé, donc *a priori*, une concentration de composés plus polaires (donc plus mobiles) dans les feuilles de blé. Sur sol non mûré, l'accumulation est à peu près identique entre les différentes parties de la plante.

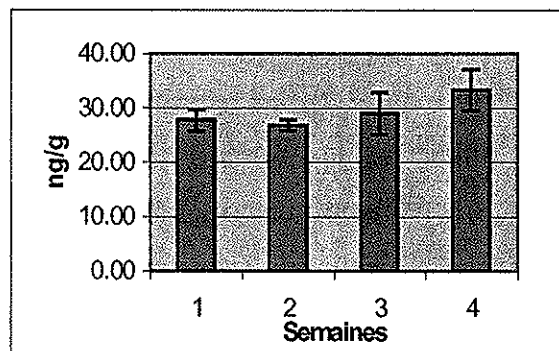
Enfin, alors que dans les essais en cultures hydroponiques, les phénomènes d'adsorption étaient théoriquement limités sur le substrat (sable), on observe un plus faible transfert du NP vers la plante. Ceci semble confirmer l'hypothèse émise précédemment : à savoir que les composés transférés vers la plante sont issus de produits de dégradation plus polaires du NP. Il est cependant nécessaire de reconduire ces essais de manière à pouvoir multiplier les échantillons afin de confirmer (ou d'infirmer) cette hypothèse par des études statistiques et de faire des expérimentations sur des sols stérilisés.



**Figure 34 : Cinétique d'absorption du NP dans les racines de radis.**  
Evolution de la radioactivité et du poids des racines dans le temps (moyenne, n=3).



**Figure 35 : Cinétique d'absorption du NP dans les feuilles de radis.**  
Evolution de la radioactivité et de la répartition sous forme de résidus solubles ou liés dans le temps (moyenne, n=3).



**Figure 36 : Evolution dans le temps des concentrations de NP dans des feuilles de radis.**  
Concentrations en ng d'équivalent par g de tissu sec. (moyenne +et, n = 3).

## 5. Cinétique d'absorption chez le radis :

La cinétique d'absorption du NP chez le radis cultivé dans la terre ne permet pas d'obtenir de nombreux résultats (figure 34) dans la mesure où la tubérisation des racines n'a pas été initiée, au profit d'un plus important développement des parties aériennes.

On constate cependant une accumulation du NP (ou de ses métabolites) au cours du temps. La courbe obtenue ne permet pas de déterminer si cette absorption présente une augmentation linéaire en fonction du poids sec ou bien si elle reste faible les trois premières semaines avant d'augmenter durant la quatrième semaine comme ce qui est observé dans les feuilles (figure 35) et précédemment chez le blé.

Les résultats obtenus sur les feuilles de radis sont plus interprétables même si l'intérêt concernant la sécurité alimentaire est moindre. On observe une forte augmentation de la radioactivité entre la troisième et la quatrième semaine alors que celle-ci reste quasiment stable pendant les vingt-et-un premiers jours. Ceci pourrait être en faveur de l'existence d'un phénomène similaire à celui observé chez le blé.

De même que chez le blé, la relation entre la radioactivité récupérée et le poids sec de l'échantillon de feuilles semble être stable au cours du temps. On note une forte proportion de composés présents sous forme de résidus solubles, plus importante que chez le blé ; il semble que la répartition entre résidus solubles et résidus liés n'évolue pas au cours du temps.

Comparativement à ce qui a été observé chez le blé, le pourcentage de composés présents sous forme de résidus solubles est plus important et se situe autour de  $67,8\% \pm 5,5$ , ce qui est souvent observé entre dicotylédones et monocotylédones. Enfin, la quantité théorique de NP transféré à la quatrième semaine reste très faible, d'une valeur de  $0,04 \mu\text{g/g}$  de poids sec (figure 36).-

	Rapport résidus solubles sur résidus liés	Rad/Poids sec (Bq/g)	% de radioactivité transférée	Concentration tissulaire de NP dans les organes (ng/g)
<b>Blé 15 jours boues</b>	<b>0,87</b>	<b>115</b>	<b>0,084</b>	<b>11,8</b>
<b>Blé 1 mois boues</b>	<b>0,97</b>	<b>83</b>	<b>0,036</b>	<b>8,6</b>
<b>Blé 15 jours terre</b>	<b>0,53</b>	<b>159</b>	<b>0,061</b>	<b>16,3</b>
<b>Blé 1 mois terre</b>	<b>0,6</b>	<b>179</b>	<b>0,023</b>	<b>18,4</b>
<b>Epinard</b>				
<b>15 jours boues</b>	<b>0,86</b>	<b>169</b>	<b>0,038</b>	<b>17,4</b>
<b>1 mois boues</b>	<b>0,62</b>	<b>111</b>	<b>0,012</b>	<b>11,4</b>
<b>15 jours terre</b>	<b>1,3</b>	<b>1365</b>	<b>0,034</b>	<b>140</b>
<b>1 mois terre</b>	<b>2,3</b>	<b>1470</b>	<b>0,009</b>	<b>151</b>
<b>Radis</b>				
<b>15 jours boues</b>	<b>0,50</b>	<b>182</b>	<b>0,030</b>	<b>18,7</b>
<b>1 mois boues</b>	<b>0,72</b>	<b>62</b>	<b>0,011</b>	<b>6,35</b>
<b>15 jours terre</b>	<b>1,75</b>	<b>834</b>	<b>0,073</b>	<b>85</b>
<b>1 mois terre</b>	<b>1,33</b>	<b>203</b>	<b>0,012</b>	<b>20</b>

**Tableau 16 : Absorption du NP dans des plantes cultivées sur sols amendés ou non par des boues de STEP. Semis immédiatement après contamination des sols par le NP. Pourcentage de radioactivité absorbée par rapport à la quantité introduite ; concentrations en ng d'équivalent NP par g de tissu sec (moyenne, n=10).**

## **6. Essais préliminaires sur sol amendé:**

Le tableau 16 montre les résultats obtenus avec des essais où les sols ont été amendés par des boues de STEP. Dans tous les cas, le pourcentage de radioactivité transférée est très faible : inférieur à 0,1%. Le pourcentage de radioactivité absorbée est inférieur dans les essais portant sur une période d'un mois, ceci pouvant être lié à la différence de radioactivité présente au départ entre les cultures à 15 et 30 jours.

On peut noter une diminution du transfert du NP en présence de boues de STEP chez le blé, l'épinard et le radis : dans tous les cas les concentrations tissulaires déterminées sont inférieures pour les plants cultivés en sol amendé que pour ceux cultivés sur sol simple. La quantité de radioactivité rapportée au poids sec est également inférieure, ce qui suggère une diminution du transfert du NP du sol vers la plante lié à l'apport de ces boues ; ceci pourrait être dû à l'apport de matières organiques qui piègent le NP. Néanmoins dans un premier temps, seules les parties d'intérêt alimentaire ont été étudiées : dans le cas du blé et de l'épinard, les parties aériennes. Il faut donc traiter les échantillons racinaires afin de déterminer s'il y a augmentation de l'absorption ou alors modification de la répartition de la radioactivité entre les différentes parties de la plante.

Chez le blé et l'épinard, le pourcentage de radioactivité transférée du sol vers la plante diminue dans le cas d'un sol amendé, ces résultats allant logiquement dans le même sens que ceux observés avec la concentration tissulaire. Chez le radis cependant, le phénomène inverse est observé à 15 jours mais le transfert est équivalent entre les deux types de sol à 1 mois ; ce phénomène ne s'explique pas pour le moment.

Enfin, chez l'épinard et le radis particulièrement, on observe une forte diminution des résidus liés formés dans les plants en sol amendé par rapport à ceux plantés en sol non traité ; aucune explication concernant cet effet n'a pour le moment été trouvée ; cependant des résultats similaires ont été obtenus en étudiant le transfert d'un herbicide, le diuron, dans les mêmes conditions et en présence d'APEO ou de NP.

Ces résultats, bien que demandant à être complétés et confirmés, car ponctuels, sont intéressants dans la mesure où ils suggèrent la possibilité d'un effet des amendements par





les boues sur le transfert du NP vers la plante. Les caractéristiques de la boue utilisée n'étant pas actuellement connues, particulièrement la teneur en polluants, il n'est pas possible d'étudier plus en détail le mécanisme d'action de ces boues.

La mise en place de ces essais devra être corrigée : tout d'abord, la récolte des plantes au temps 15 jours est à supprimer dans la mesure où elle ne permet pas d'obtenir des plants suffisamment développés pour assurer un bon traitement des échantillons. Par ailleurs, la structure des sols utilisés devra être modifiée car elle n'assure pas une bonne croissance des plantes. Enfin, il sera nécessaire de refaire ces essais avec des boues dont la structure et la composition sont connues, afin de mieux contrôler les conditions d'expérimentation et de mieux analyser la conséquence d'un amendement par des boues de STEP.

L'ensemble des résultats obtenus suggère l'existence d'un faible passage du NP depuis le sol vers la plante (malgré sa forte lipophilie) ainsi que d'un transfert notable des composés d'absorption vers les parties aériennes du végétal. L'accumulation du NP (et/ou de ses métabolites) dans les racines de radis ou dans les feuilles d'autres plantes consommables, de l'ordre de quelques  $\mu\text{g/g}$  de poids sec, pose le problème de la sécurité alimentaire, d'autant que l'on ne possède pas de données concluantes sur le métabolisme du NP dans ces organes. Cependant, le stockage des résidus sous forme majoritairement liée entraîne *a priori* une diminution de leur biodisponibilité (étudiée chez l'animal) et donc une diminution du risque pour le consommateur. Une étude (Mathew *et al.*, 1998) suivant le devenir de résidus de triazines depuis leur fixation par la plante jusqu'à l'excrétion chez le rat confirme une telle possibilité ; néanmoins d'autres études portant sur le même sujet offrent des résultats divergents voire contradictoires.

Les cultures en terre ainsi que la cinétique d'absorption chez le blé mettent en évidence le rôle prépondérant de la composante sol : un temps de latence avant absorption du NP par la plante suggère que le NP n'est absorbé qu'après sa dégradation en composés plus polaires, probablement due aux micro-organismes du sol, ce qui tendrait vers une diminution du risque. Cette hypothèse est confirmée par les différences observées entre les cultures de blé (sol mûré ou non et cultures hydroponiques) dans lesquelles la quantité de NP absorbée ainsi que la répartition dans les organes sont dépendantes des variations de la composante sol. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de procéder à de nouveaux essais, telle



qu'une cinétique d'absorption sur sol axénique afin d'étudier le transfert du NP vers la plante en l'absence de dégradation par les micro-organismes du milieu ou encore l'étude en parallèle de l'absorption du NP chez la plante et de son devenir dans le sol.

L'étude des métabolites du NP dans le sol et dans la plante entière reste indispensable afin de déterminer le risque d'exposition réelle. Le potentiel oestrogénique des composés de dégradation devrait être inférieur à celui du NP, particulièrement en cas d'attaque du cycle aromatique par les micro-organismes du sol.

La pré manipulation réalisée sur sol amendé suggère, même si cela reste à confirmer, un transfert du NP diminué en présence de boue de STEP ainsi qu'une modification dans le stockage des résidus sous forme liée. Une hypothèse concernant la première observation pourrait être que le NP apporté reste piégé par les matières organiques des boues et ne soit en conséquence pas disponible pour la plante ; néanmoins, une forte augmentation du temps de demi-vie du NP dans des agrégats de boues est observée (Hesselsoe *et al.* 2001). Aucune hypothèse n'est par contre avancée concernant l'influence des boues sur la formation des résidus liés dans la plante.

Enfin, cette étude a été effectuée en utilisant du [ $^{14}\text{C}$ ]- 4-*n*-NP, isomère linéaire du NP, comme traceur radioactif du devenir du NP commercial ; or ce dernier est un mélange d'isomères dont rien ne laisse à penser qu'il a le même comportement dans le sol ou dans la plante que le 4-*n*-NP seul. Au contraire, une étude (Düring *et al.* 2002) laisse à penser qu'il pourrait s'agir d'un biais important dans les études menées jusqu'alors. Une solution serait d'utiliser un mélange d'isomères marqués ou bien un isomère marqué parmi les plus représentatifs du mélange. Cette idée se heurte à la difficulté et au coût de synthèse de tels composés : le mélange commercial est obtenu en ayant recours à l'emploi de réacteurs de type industriel et à des mécanismes physiques comme le cracking difficilement réalisables en laboratoire et en radiomarquage.



# CONCLUSION

Le NP est un composé polluant qui possède une activité perturbatrice du système endocrine. La contamination de l'environnement par ce produit est donc un sujet préoccupant car il s'agit d'un composé produit massivement à l'échelle planétaire et destiné à de nombreux usages. La découverte fortuite de ses activités oestrogéniques ou encore la contamination de l'eau du robinet liée à l'utilisation de tubes en PVC situe bien l'échelle ubiquitaire du problème. La contamination des milieux aquatiques par le NP est également préoccupante car à terme, elle peut avoir de nombreux impacts négatifs, (comme des phénomènes de féminisation) sur les populations de poissons et d'invertébrés. La contamination du sol existe aussi et même des zones en théorie préservées semblent ne pas être à l'abri de dépôts de NP d'origine atmosphérique.

L'utilisation d'un traceur radioactif dérivé de l'isomère linéaire du NP (le 4-*n*-NP) dans la majeure partie des études ne reflète pas le comportement du NP proprement dit. L'utilisation d'isomères ramifiés pourrait offrir une meilleure estimation du risque mais elle se heurte à des problèmes de coût et de synthèse. Une solution serait peut-être le recours à l'octylphénol (OP) de structure proche et dont il existe des isomères ramifiés radiomarqués.

Notre étude avait pour but d'évaluer le risque de transfert du NP dans des plantes cultivées sur des sols ayant reçu des amendements de boues de STEP, habituellement riches en NP. Les boues pourraient avoir un effet sur le transfert du NP vers la plante, mais les essais réalisés ici, bien qu'ils soient justifiés, ne sont pas suffisants pour permettre de conclure à une telle affirmation. En ce qui concerne l'accumulation du NP ou de ses métabolites dans les plantes étudiées, il faut considérer plusieurs aspects : en ce qui concerne le blé, même s'il existe un transfert vers les parties aériennes, il est peu probable que les composés accumulés se retrouvent dans la graine ; dans ce cas le risque pour le consommateur semble quasiment nul. Dans le cas du radis par contre, il ne peut être exclu même s'il reste faible.

La présence de composés d'absorption accumulés dans la plante sous la forme de résidus liés réduit *a priori* le risque alimentaire dans la mesure où ceux-ci seraient moins biodisponibles pour le consommateur. Par contre, la métabolisation du NP en dérivés

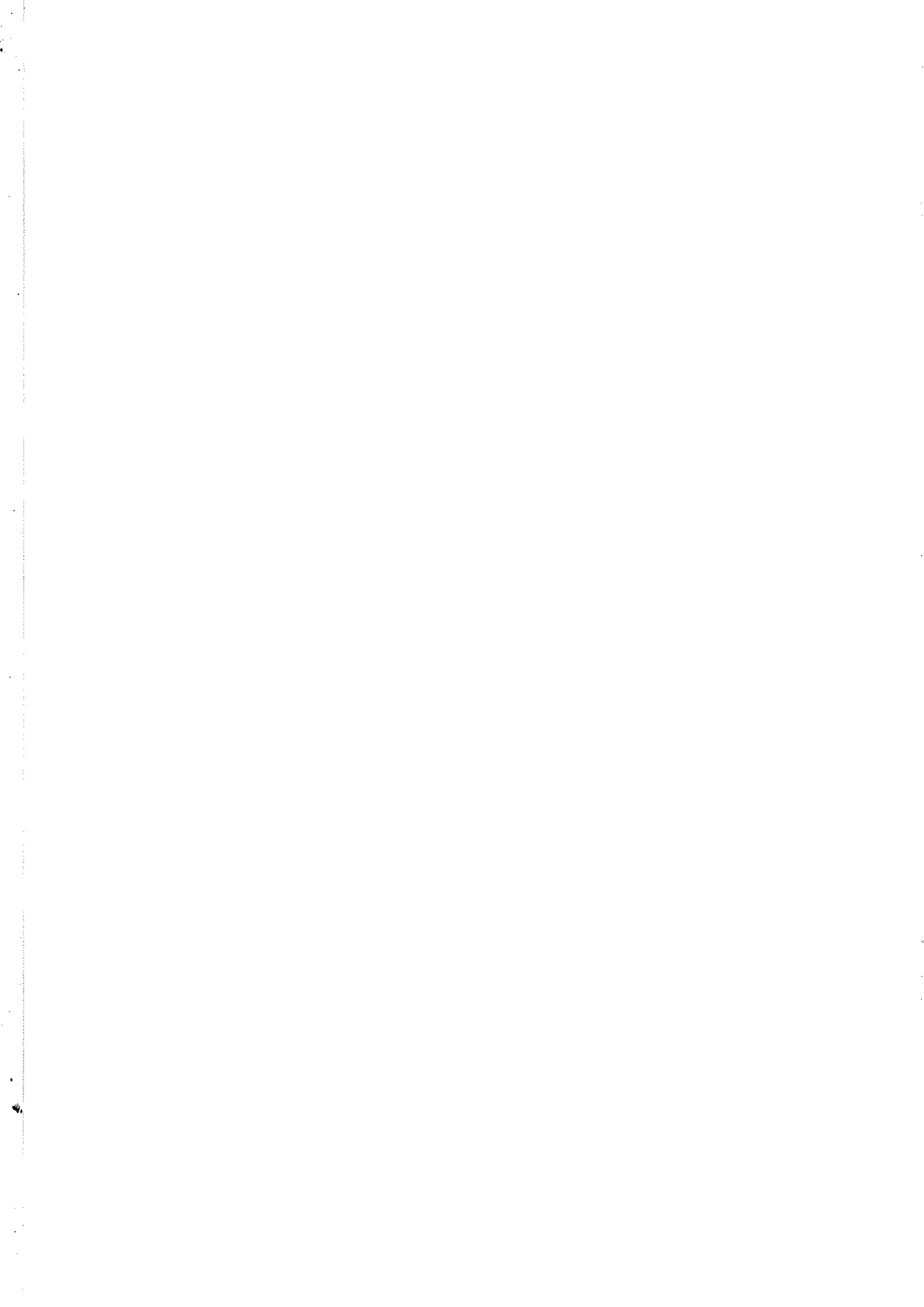


conjugués dans les cellules et dans les feuilles de blé ne permet pas de conclure à une diminution du risque : si les composés conjugués du NP ont effectivement une activité oestrogénique moindre voire nulle, les liaisons sucre-aglycone sont labiles et peuvent rapidement être hydrolysées dans le tractus digestif en cas d'ingestion d'aliments renfermant ces composés. Cette étude du métabolisme reste incomplète tant que celle-ci ne sera pas réalisée à partir de plantes entières : les études sur feuilles excisées, se déroulant sur une période de courte durée peuvent servir de modèle mais restent insuffisantes car elles ne rendent pas compte d'un possible métabolisme dans la racine avant le transfert vers les feuilles.

L'hypothèse d'une dégradation du NP par les bactéries du sol avant absorption par la plante doit être vérifiée. Si cette hypothèse se révélait exacte, le problème de sécurité alimentaire représenté par le NP pourrait être exclu : les produits de dégradation du NP par les micro-organismes ont probablement une toxicité moindre, en premier lieu par dégradation de la chaîne carbonée par  $\beta$ -oxydation et surtout par ouverture du cycle aromatique, ce qui supprimerait le potentiel oestrogénique. Par ailleurs, le NP se retrouvant de manière hétérogène dans les sols contaminés (hétérogénéité liée à la forte adsorption du NP sur les boues et à la pratique d'épandage), le développement de l'appareil racinaire est susceptible de jouer un important dans l'absorption du NP par les plantes ; le NP contaminant les sols en surface, des plantes dont le système racinaire s'enfonce peu en profondeur mais s'étale dans l'espace seraient plus à même d'être mises en contact avec les résidus de NP. Enfin, en ce qui concerne les plantes à racines tubérisées, susceptibles de stocker les contaminants dans cet organe, il serait intéressant de comparer le transfert du NP (ou d'autres polluants organiques ou métalliques) dans des plantes présentant des différences d'organisation et de développement de la tubérisation avec celles du radis étudié ici ; la betterave et la carotte par exemple.

Au-delà du risque alimentaire, il faut prendre en compte les effets de la contamination des sols par le NP pour les organismes terrestres. Celle-ci semble être moins problématique et moins préjudiciable que la contamination du compartiment aquatique. Les effets phytotoxiques du NP semblent rester limités et le NP possède un faible temps de demi-vie dans le sol en conditions aérobies et est dégradé et minéralisé au bout de quelques semaines (Litz, 1998 ; Topp, 1999). La principale voie d'entrée du NP dans l'environnement reste les boues de STEP, dans lesquelles les conditions d'anaérobie augmentent considérablement la





rémanence du NP. L'impact du NP présent dans les boues reste *a priori* limité pour les végétaux et les champignons (Kollmann *et al.* 2003) mais reste présent pour les invertébrés du sol (Gejlsberg *et al.* 2001). La méthode d'introduction du NP dans les sols influant sur sa toxicité envers les organismes (Scott-Fordsman et Krogh, 2003), d'autres études doivent être menées afin de mesurer l'impact du NP sur les organismes terrestres.

De nouveaux traitements physiques ou microbiologiques des boues (Banat *et al.* 2000 ; Fuji *et al.* 2003) à l'étude, pourraient permettre à terme une élimination de la majorité des résidus de NP et une diminution significative des concentrations finales dans les boues et donc dans l'environnement. Si l'étude du comportement du NP dans les sols et dans la plante est intéressante et nécessaire pour mieux appréhender les risques encourus, la solution au problème de la contamination se trouve (au moins en partie) dans la découverte de nouveaux traitements des effluents visant à réduire les concentrations de NP rejetées dans l'environnement.



**DISCUSSION**

**GENERALE**



DISCUSSION

GENERALE

## LE NONYLPHENOL, ASPECTS ANALYTIQUES

### Les limites de l'utilisation d'un isomère linéaire du NP comme traceur et modèle dans l'expérimentation :

L'étude menée ici ainsi que la majorité des études ayant porté sur le métabolisme et la dégradation du NP et utilisant un traceur radioactif de ce composé sont basées sur l'emploi d'un isomère linéaire du NP (le 4-*n*-NP). Or nous avons vu que le NP commercial est en fait un mélange constitué d'une 20<sup>aine</sup> d'isomères dont le 4-*n*-NP n'est qu'un très faible représentant (moins de 1% de la proportion du mélange total), les expérimentations menées jusqu'alors avec ce composé sont elles donc représentatives du comportement du mélange commercial ou bien d'un autre isomère ramifié ? Et pourquoi alors choisir l'isomère linéaire comme point de départ dans une étude sur le NP ?

Concernant la seconde question, il faut aborder le problème sous un angle un peu plus trivial : pour des questions d'approvisionnement il est parfois plus simple de recourir au 4-*n*-NP, celui-ci étant disponible dans le commerce à la fois sous forme radiomarkée et non radiomarkée, ce qui évite de recourir à de parfois longues opérations de synthèse et de purification. Par ailleurs, il est plus aisé de recourir au 4-*n*-NP radiomarké pour des questions de coût, ce dernier étant moins cher à se procurer qu'un éventuel isomère ramifié du NP.

D'un point de vue analytique en CLHP, l'utilisation de l'isomère linéaire permet de « simplifier » l'obtention de chromatogrammes lisibles, en particulier en ce qui concerne les études de métabolisme. Si le mélange commercial de NP ne sort en CHLP la plupart du temps que sous la forme d'un seul et large pic, le grand nombre de dérivés obtenus après métabolisation (plusieurs métabolites par isomère) rend très difficile la lecture d'un chromatogramme : dans notre étude il a déjà été difficile d'obtenir un chromatogramme lisible du métabolisme d'un seul isomère linéaire du NP.

Par ailleurs, la synthèse d'un traceur radioactif se heurte à de nombreux problèmes, et il paraît difficile pour un laboratoire de pouvoir synthétiser du NP commercial marqué par un



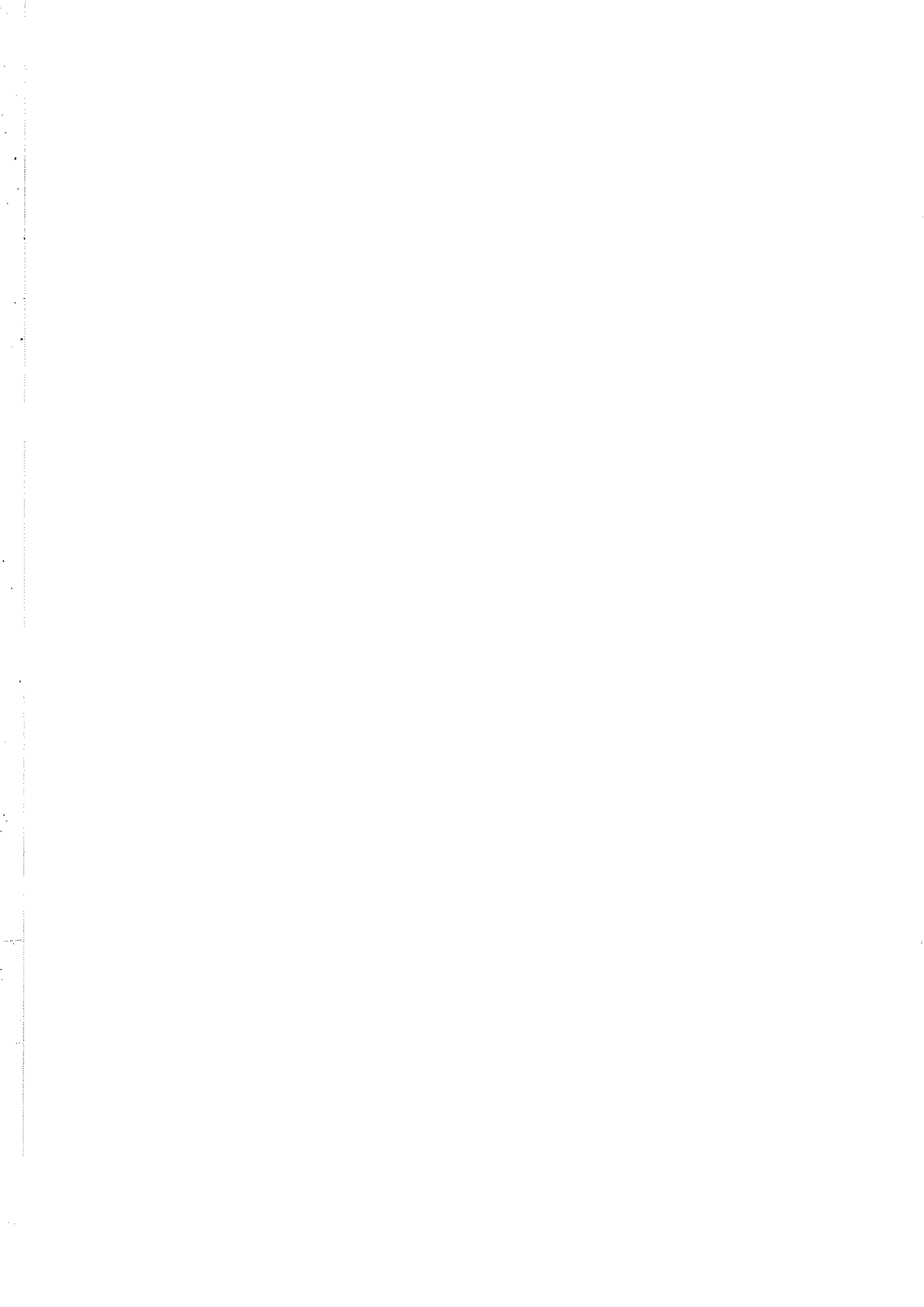
isotope radioactif : ce dernier est obtenu en ayant recours à l'emploi de réacteurs de type industriel et à des mécanismes physiques comme le cracking difficilement réalisables en laboratoire et en radiomarquage. Des études semblent pourtant avoir été menées avec des mélanges d'isomères radiomarqués du NP : Düring *et al.* (2002) par exemple ont utilisé une méthode de synthèse mise au point par Ekelund *et al.* en 1990 qui consiste en la synthèse de NP radiomarké par addition de phénol uniformément marqué sur le cycle à un mélange d'isomères du nonène dans des conditions acides.

Il faut cependant reconnaître que l'utilisation du 4-*n*-NP ne permet pas de rendre compte du comportement réel du NP dans l'environnement et que les données obtenues à partir d'études utilisant le 4-*n*-NP comme modèle pour simuler le NP doivent être reconsidérées avec prudence. L'étude de Kim *et al.* (2004) sur les variations du potentiel oestrogénique des isomères du NP fait état pour le 4-*n*-NP d'une activité oestrogénique nettement inférieure à celle des autres congénères, y compris par rapport à celle du mélange. Dans ce cas, cela ne pose *a priori* pas de problème puisque les tests d'oestrogénicité qui ont été réalisés pour déterminer l'activité oestrogénique du NP ont été réalisées avec le mélange commercial. Néanmoins, dans ce cas l'activité du 4-*n*-NP n'est pas représentative de celle du NP.

Mais au-delà du potentiel oestrogénique se pose le problème du comportement du 4-*n*-NP dans l'environnement : Düring *et al.* (2002) ont montré que les différents isomères du NP se comportaient différemment dans le sol : l'isomère linéaire semble avoir plus d'affinité pour une phase organique que le NP, les auteurs concluent en suggérant que les ramifications de la chaîne alkyle altéreraient la capacité du NP à se lier à des matières organiques et limiteraient ses interactions avec la matrice du sol.

Par ailleurs, plusieurs études (dont celle-ci) suggèrent que le NP est dégradé dans le sol sous l'action de microorganismes, or la structure de la molécule cible des microorganismes joue un rôle important dans la capacité de ces dernières à la dégrader : un encombrement stérique important (du à des ramifications dans la structure de la molécule) est susceptible de diminuer la vitesse de dégradation de la molécule par des bactéries et donc de prolonger la demi-vie du composé. Or dans ce cas, le 4-*n*-NP est un mauvais modèle pour une étude de dégradation ou de minéralisation : sa structure linéaire facilite l'attaque des bactéries du sol et n'est donc pas représentative du devenir réel du NP dans le sol. A titre d'exemple, on





peut citer Hesselsøe *et al.* (2001) qui utilisent l'isomère linéaire pour déterminer le temps de dégradation du NP en conditions aérobies (celui-ci, estimé dans cette étude à 38 jours est donc peut être sous estimé) il en va de même pour l'étude de Topp et Starratt (1999) qui utilisent un traceur radioactif du NP qui semble aussi être l'isomère linéaire.

Enfin, au niveau métabolique, Zalko (2002) dans son étude du métabolisme du NP chez le rat remarque que des résultats obtenus avec le 4-*n*-NP ne peuvent pas être extrapolés aux isomères ramifiés : la  $\beta$ -oxydation qui est dans l'étude décrite comme une des principales voies métabolique du 4-*n*-NP ne peut s'appliquer que sur des chaînes carbonées linéaires et donc n'interviendrait pas ou peu dans le métabolisme d'un isomère ramifié du NP ; dans un tel cas, la voie de l'hydroxylation serait peut-être prépondérante, et les métabolites obtenus différents de ceux observés dans cette étude. De plus les métabolites obtenus pourraient avoir des activités oestrogéniques différentes : si la  $\beta$ -oxydation conduit à la formation de métabolites du NP à chaîne alkyle réduite, et *a priori* à activité oestrogénique altérée, l'hydroxylation du NP pourrait conduire à l'obtention de métabolites à activité accrue du fait de la présence de deux groupes hydroxy.

L'utilisation du 4-*n*-NP comme modèle pour des études de transfert ou de dégradation semble donc être sujette à caution et en ce qui concerne le métabolisme, les résultats ne peuvent pas être extrapolés au NP commercial. Dans ce cas le recours serait peut-être la synthèse d'un isomère ramifié du NP, encore faudrait-il savoir lequel choisir ; serait-il plus judicieux de choisir l'isomère le plus représenté dans le mélange ? Celui présentant le plus fort potentiel oestrogénique ? Le plus ramifié ? Mais encore faudrait-il pouvoir synthétiser des isomères de ramification à la demande. *A priori* la solution reste la synthèse d'un mélange d'isomères du NP représentatifs (au moins une dizaine d'isomères) ou la synthèse directe de NP radiomarqué.



### Précautions à prendre dans un dosage de NP :

La réalisation d'un dosage de NP et/ou de ses métabolites à partir d'un milieu biologique nécessite la prise d'un certain nombre de précautions. Tout d'abord, le NP s'adsorbant très fortement sur des parois plastiques, le recours à des tubes, filtres, raccords de tuyaux, cônes pour pipettes ... en plastique est proscrit ; de même dans certains laboratoires l'utilisation de gants de protection en vinyle est évitée pour les techniciens travaillant sur le NP. Tous les récipients utilisés doivent être en verre afin de limiter les pertes de composé. Si possible, la verrerie doit être traitée de manière à limiter les phénomènes d'adsorption (par silanisation par exemple). Les cônes pour pipette doivent être de type « *low-binding* », en silicone, afin de limiter la perte de produit sur les parois du cône. Il est aussi possible de remplacer l'utilisation des micropipettes par l'utilisation de seringues type « Hamilton » en verre.

Lors de la concentration des échantillons, il est préférable de recourir à une évaporation douce sous flux d'azote afin d'éviter la perte de produit par volatilisation (le NP et ses métabolites ne sont pas des composés spécialement volatiles, néanmoins leur tension de vapeur élevée peut entraîner de tels phénomènes). Une évaporation sous vide à l'aide d'un appareil de type speed-vac est à limiter à la concentration à un volume limite supérieur ou égal à 2 ml. Dans le cas de gros volumes, le rotovapor reste une solution envisageable, si l'on stoppe l'évaporation avant d'arriver à sec. La principale contrainte dans la concentration d'échantillons renfermant du NP reste donc le temps qui augmente d'autant plus que l'évaporation est lente.

Après concentration, la reprise des échantillons doit s'effectuer dans un volume minimal de méthanol ou d'acétonitrile, compte tenu de la très faible solubilité du NP dans l'eau.

Enfin, concernant la CHLP, il faut veiller à bien nettoyer la boucle d'injection : la présence dans celle-ci de résidus organiques entraînerait une adsorption du NP sur ces derniers et ainsi provoquer une perte de produit. Avant d'injecter, il est préférable d'homogénéiser l'échantillon 2 minutes au Vortex puis de saturer la seringue d'injection par plusieurs passages avec ce dernier.



D'une manière générale et dans le cas de la radio-CLHP, il faut réaliser des contrôles après chaque opération, laver les parois par un solvant type méthanol et effectuer des comptages de radioactivité afin de déterminer l'origine et/ou de quantifier une perte de radioactivité et donc de produit.

### **Utilisation de la CLHP dans l'étude analytique du nonylphénol, possibilités et limites :**

L'utilisation de la CLHP en phase inverse avec une colonne de silice greffée classique ne permet pas la séparation et la quantification des différents isomères du NP en un seul passage : le NP ne sortant jamais mieux que sous la forme d'un unique pic alors que l'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a permis de séparer 22 isomères du NP ; le principal inconvénient de l'analyse par CG étant qu'il s'agit d'une méthode destructrice et que l'on ne peut pas récupérer le composé après son passage dans la colonne (Gundersen, 2001).

L'utilisation de la CLHP en phase inverse permet néanmoins d'établir des dosages du NP dans un milieu étudié : les limites de détection varient en fonction du détecteur associé et sont respectivement de l'ordre de 100 ng (injectés) pour des détecteurs UV, et de l'ordre de 10 ng (injectés) pour un détecteur à fluorescence ; les réglages étant les suivants : 273 nm pour un détecteur UV et 225 nm d'excitation / 301 nm d'émission pour le fluorimètre. L'utilisation d'un détecteur de radioactivité type flow-one n'est limitée que par la quantité de radioactivité présente dans l'échantillon. A titre de comparaison, la GC/SM est un peu moins sensible avec une limite de détection de l'ordre de 0.5 ng/ $\mu$ L de solution injectée qu'une détection par fluorescence dont la sensibilité est de 0.1 ng/ $\mu$ L d'échantillon injecté, sachant que les volumes à injecter sont différents dans les deux méthodes.

Pour parvenir à séparer les isomères du NP en CLHP, les opérations sont plus complexes ou demandent des appareillages plus spécifiques. Kim *et al.* (2004), pour réaliser leur étude de l'activité oestrogénique ont d'abord séparé les isomères par CLHP, la méthode mise en place est cependant complexe et demande jusqu'à trois passages en CLHP selon les fractions. Un premier passage préparatif est réalisé en phase normale sur une colonne de silice non greffée avec une phase mobile composée en majorité d'hexane, le pic obtenu est divisé en



6 fractions dont une est repassée en CLHP phase inverse sur une colonne de type ODS, deux fois pour obtenir en tout 5 nouvelles fractions. Tandis qu'une autre est re-soumise à un passage par le système en phase normale pour donner 4 nouvelles fractions dont une est traitée sur colonne ODS en phase inverse et une autre passée sur une colonne HyperCarb. Cette méthode fastidieuse a cependant permis d'isoler huit isomères du NP dont tous possèdent un carbone tertiaire en  $\alpha$  du cycle aromatique. Cette technique par CHLP a cependant dû être complétée pour l'identification de la structure des isomères à d'autres techniques comme GC/SM et la RMN.

Plus simplement Gundersen (2001) a obtenu la séparation d'un mélange commercial de NP en une série de 12 pics (contre 22 identifiés par GC capillaire/SM) en utilisant une colonne de type HyperCarb équipée d'une pré colonne de type ODS-AQ (qui augmente la résolution des pics). La phase mobile étant constituée d'acétonitrile et d'eau. La détection est assurée par un fluorimètre réglé à 277 nm pour l'excitation et 300 nm pour l'émission. L'auteur suggère qu'au vu des résultats obtenus, dans un tel système, les composés qui sont élués le plus tôt sont ceux qui sont le plus ramifiés. La quantité limite de composé à injecter pour obtenir un signal lisible est estimée à 10ng (estimation basée sur des injections de 0.1  $\mu$ l de solution de NP standard à 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l). La détermination de la structure des composés séparés reste néanmoins subordonnée à l'utilisation de la SM et/ou de la RMN.

L'ordre de sortie des isomères du NP en CHLP sur colonne hypercarb est le même qu'en GC/SM. L'utilisation d'une colonne de type hypercarb doit néanmoins s'entourer de certaines précautions : une partie des composés à séparer peut en effet rester piégé sur la phase stationnaire et ainsi fausser une éventuelle étude quantitative. Une hypothèse serait que la colonne doit se saturer en produit avant de le relarguer, une quantité donnée de composé resterait fixé sur cette dernière ; par exemple dans le cas des isomères du NP, une quantité donnée et du même ordre de grandeur de chaque isomère resterait fixée sur la colonne, et ce quelle que soit la proportion de l'isomère dans le mélange. Si une colonne de type hypercarb reste un bon outil pour effectuer une séparation, il semble que son application soit limitée dans le cas d'une étude quantitative.





**CONCLUSION**

**GENERALE**





De nombreuses études ont été réalisées et de nombreuses données collectées sur les perturbateurs endocriniens depuis plusieurs années. L'ensemble des résultats montre que la question de leurs effets potentiels sur la santé humaine est préoccupante et qu'il serait déraisonnable d'ignorer ou de sous évaluer le problème. Certes, les liens de cause à effet ne sont pas clairement démontrés pour de nombreux composés et l'extrapolation à l'homme de résultats obtenus chez l'animal doit s'entourer de prudence. Néanmoins, on ne peut que constater l'accumulation de suspicions et parfois de preuves apportées ces études : augmentation de l'incidence de certains cancers hormonaux, recrudescence de malformations et de troubles de la reproduction ou du comportement des populations (humaines ou animales) en rapport avec des contaminants environnementaux... Pour certains scientifiques, l'ensemble de ces éléments devrait nous inciter à être plus radicaux dans notre manière d'aborder la problématique et à appliquer le principe de précaution à l'ensemble des composés incriminés afin d'éliminer ou de réduire de manière conséquente leur utilisation industrielle (Markey *et al.* 2003).

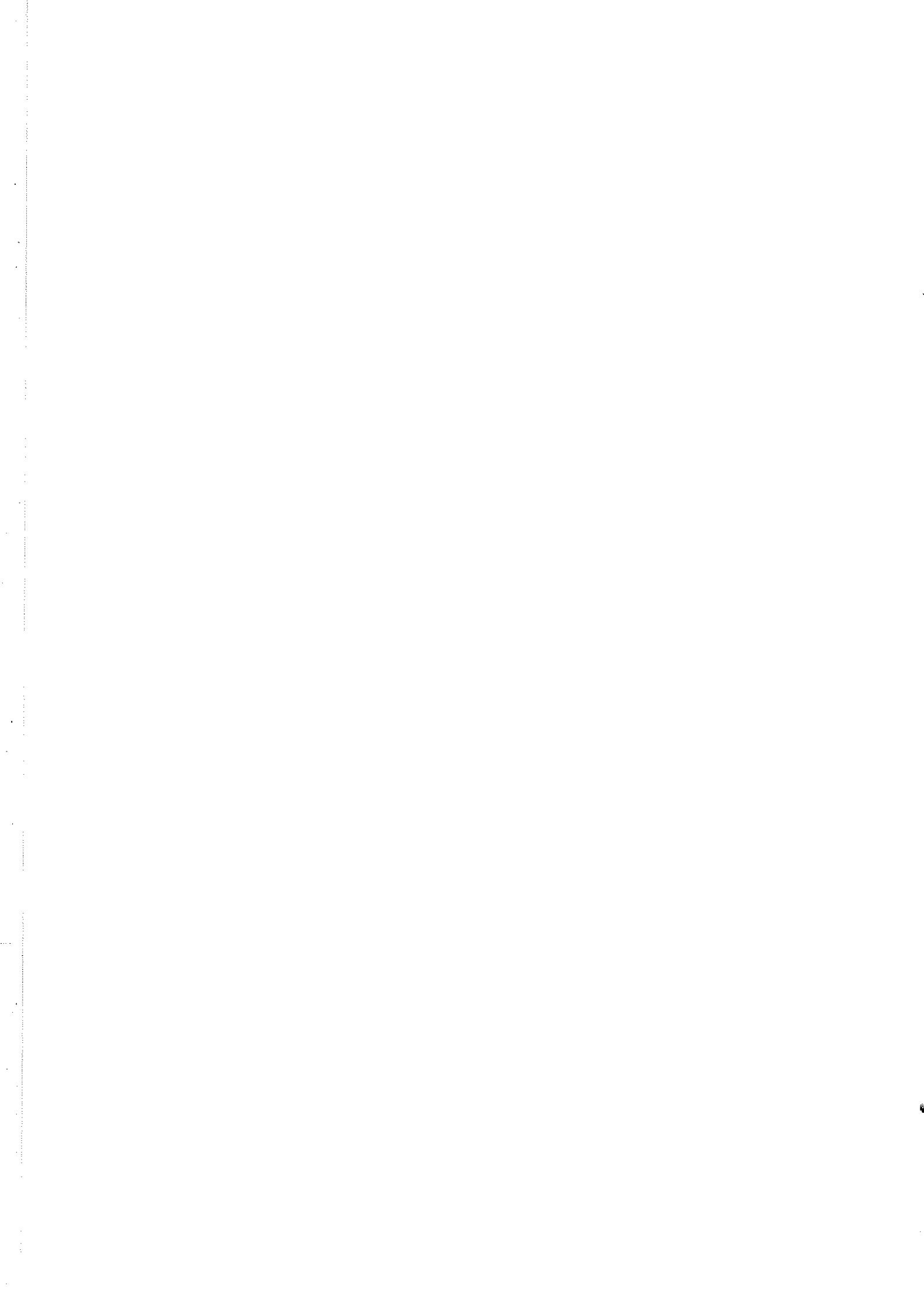
Ce point de vue reste lourdement discuté ; une des principales controverses à cette vision est que les composés perturbateurs endocriniens, en particulier les oestrogénomimétiques (les plus étudiés jusqu'à présent) sont de bien moins puissants agonistes (ou antagonistes) que les hormones naturelles endogènes. Une autre idée émise est celle que ces contaminants ne sauraient avoir un impact sur la santé aux doses où ils sont présents dans l'environnement. Or il a été montré que ces molécules pouvaient agir de manière additive, non seulement entre elles mais aussi avec les hormones endogènes : les xénoestrogènes par exemple (considérés comme faiblement oestrogéniques) sont susceptibles de déplacer les courbes dose-réponse de l'oestradiol vers la gauche (augmentation de la réponse pour des doses équivalentes) ; ce point de vue ne devrait donc plus être de mise. Par ailleurs, nous avons vu que les hormones endogènes ainsi que les perturbateurs environnementaux présentent des courbes effet-dose non linéaires et pour lesquelles de faibles doses sont susceptibles d'entraîner des réponses importantes. Enfin, le fort tonnage de production de toutes ces molécules représente à lui seul un élément de préoccupation. Les années d'études sur les perturbateurs endocriniens nous montrent à quel point tant la vie animale que la vie humaine sont modelées et dépendantes de leur environnement ; la vision du « tout ADN » selon laquelle le développement d'un organisme n'est que le résultat de l'application de son programme génétique est dépassée : un organisme vivant est un système ouvert sur son environnement et en constante interdépendance avec lui (Markey *et al.* 2003).



Concernant les perspectives d'études sur les perturbateurs endocriniens, les études devraient s'orienter vers des activités autres que l'oestrogénicité et des cibles autres que les seules fonctions de reproduction. Les études portant sur l'impact de contaminants sur la thyroïde comptent parmi ces nouveaux essais, l'étude des autres fonctions du système endocrinien est pour l'instant à l'état d'ébauche. Une autre piste à l'étude est celle des effets immunotoxiques des perturbateurs endocriniens. Il serait aussi nécessaire de plus se rapprocher de la réalité environnementale : les organismes vivants n'étant pas soumis à l'action d'un seul contaminant mais bien à une « soupe » de polluants. L'étude en laboratoire d'un seul de ces composés sur un système isolé ne saurait être représentative de ce qui peut se passer dans notre environnement. Par ailleurs, les recherches effectuées sur les perturbateurs endocriniens montrent que ces derniers peuvent avoir plusieurs cibles ou plusieurs mécanismes d'action (activité oestrogénique ET anti-androgénique du DDE, atteintes thyroïdiennes et des fonctions de reproduction pour les PCBs...), l'investigation d'une seule activité ou d'une seule cible potentielles reste par conséquent insuffisante.

Mais avant tout, il faudrait considérer que c'est un système entier qui est la cible potentielle des perturbateurs endocriniens. Le système endocrinien est une organisation extrêmement complexe qui ne peut être réduite à un seul ensemble de fonctions de reproduction ou de fonctions thyroïdiennes. Cet ensemble est constitué de nombreuses unités dont chacune est reliée à toutes les autres, interagit avec toutes les autres par un système complexe de rétroactions. Agir en un point de ce système, c'est agir sur son ensemble. Or la globalité du système n'est pas encore prise en compte dans les études, par manque d'outils et d'une approche adéquate. Néanmoins, la problématique des perturbateurs endocriniens, en malmenant quelque peu les habitudes, force le chercheur à tendre vers une intégration des connaissances, vers une approche plus globale de la situation.

Au-delà de la seule limite que peut constituer l'absence d'outils analytiques adéquats, c'est la vision classique des biologistes qu'on pourrait remettre en cause : l'approche réductionniste classique (l'approche « par le bas ») d'un problème. Cette approche consiste à diviser un ensemble en éléments qui sont étudiés indépendamment les uns des autres, chacun en fonction de ses propres structures, fonction et chimie. Si cette approche (qui consiste donc à réduire le comportement d'un organisme à celui de ses constituants cellulaires) a énormément fait progresser les connaissances en biologie et en physique, elle fait preuve de ses limites lorsqu'il s'agit d'étudier un organisme vivant dans son ensemble. Dans le cas des



perturbateurs endocriniens, elle ne permet pas de rendre compte de leurs effets sur l'ensemble du système, de reproduire la non linéarité des réponses observées, de prévoir les effets des phénomènes d'additivité ni de coller à la réalité. Si le cloisonnement induit par le réductionnisme permet d'isoler un ou deux paramètres afin de les mesurer, la réponse devient plus complexe et n'est plus prévisible dans le cas d'un organisme entier du fait qu'une cellule, une fonction ou un organe n'est pas isolé des autres mais dépend de la bonne marche du reste de l'organisme et agit lui-même en retour sur le bon fonctionnement de celui-ci.

Ne faudrait-il pas considérer une autre approche « par le haut » du Vivant, une approche plus « holistique » considérant l'organisme dans sa globalité ? La théorie dite des propriétés (ou principes) émergentes considère par exemple que certaines propriétés d'organisation n'existent pas au niveau élémentaire mais « émergent » dès que le niveau de complexité dépasse un seuil critique ; un organisme possédera donc des propriétés qui n'existent pas au niveau des structures élémentaires qui le composent. Pascal disait : « le tout est plus que la somme de ces parties » ; or l'approche réductionniste est incapable de prendre en compte de telles propriétés. Ainsi s'il est toujours possible de diviser une problématique pour en étudier chaque élément, il est aussi facile de se perdre dans le détail et d'explorer à l'infini chacun de ces éléments sans jamais en avoir fini (Raymond Devos a dit « un bout c'est irréductible, si on coupe le bout d'un bout, on a toujours deux bouts ») mais au final quel est le réel intérêt (excepté l'intérêt intellectuel) qu'apporte une telle démarche ? Il semble tout de même plus important d'étudier un problème dans son ensemble afin de lui trouver une solution.

Pour en venir à l'écotoxicologie, les études portant sur les perturbateurs endocriniens s'inscrivent dans un contexte environnemental et planétaire et les réflexes conditionnant l'approche du biologiste doivent changer et s'inscrire eux aussi dans un cadre plus large. L'approche dominante consiste à n'accorder de crédit à des résultats que si toutes les conditions expérimentales sont connues et contrôlées, or dans le cadre de l'écotoxicologie ce concept paraît bien hors de propos : d'une part, il est impossible de contrôler notre environnement ainsi que les phénomènes qui s'y déroulent, et d'autre part les résultats obtenus dans de telles études ne sont aucunement extrapolable à des conditions réelles : une expérience en laboratoire ne peut mimer ou prendre en compte que quelques phénomènes, et ce dans un milieu fermé alors que l'environnement est un milieu complexe, en constant mouvement, en constante interaction avec lui-même et pour certains chercheurs comme James





Lovelock capable d'autorégulation. Il serait peut être de mettre de côté le « tout contrôlé » et d'accepter une perte de précision dans les résultats au bénéfice de la réalité environnementale.

Au-delà du seul problème représenté par les perturbateurs endocriniens, la vision mécaniste de la biologie est peut être à remettre en cause. Depuis l'émergence de la physique quantique, on a vu les notions d'indéterminisme et de chaos débouler dans les lois bien prévisibles et linéaires de la physique, la notion de dualité de la matière est ainsi apparue. Or si cela a causé une révolution dans le monde de la physique, la biologie semble ne pas faire grand cas de ces découvertes et continue à se focaliser sur des interactions et des phénomènes d'ordre chimique, bien « matériels », comme si la matière et les lois auxquelles étaient soumis les biologistes étaient différentes de celles qu'étudiaient les physiciens, comme si les lois établies par le physicien n'avaient plus de valeur lorsque l'on s'attaquait aux organismes vivants. Le paradigme du biologiste est en retard sur celui du physicien, si ce dernier à accepté la part d'indéterminisme, de hasard et de chaos inhérent aux lois du cosmos, le biologiste considère encore trop souvent l'organisme vivant comme une mécanique inerte répondant à des schèmes d'organisation linéaires et prévisibles.

La Science, victime d'un excès de zèle, s'est cloisonnée en différents secteurs tellement spécifiques qu'ils représentent chacun un monde à part entière tourné vers lui-même et qui ne communique que trop peu avec l'extérieur. Cette « ultra-spécialisation » se fait pourtant au détriment de la Science elle même : en limitant une réelle mise en commun des connaissances et des différents points de vue qui seuls peuvent permettre la résolution d'un problème. A titre d'exemple, il est intéressant de comparer les visions de chercheurs de formation différente : les biologistes et les médecins par exemple, les premiers ont une démarche réductionniste « pure et dure » basée sur la formulation d'hypothèses, puis leur vérification expérimentale et prônent la démarche expérimentale ; les seconds quant à eux acceptent une part d'observation et d'empirisme dans leur démarche, en ne s'encombrant pas toujours de démontrer par l'expérimentation le mécanisme des faits observés. Cette dernière approche se fait selon une vision de santé publique, de bénéfice et de risque et donc selon une vision plus pratique de la problématique. Aucune de ces deux visions n'est exempte de défauts et aucune n'est meilleure que l'autre, simplement on constate trop souvent que biologistes et médecins (que les chercheurs en général) se critiquent les uns les autres au lieu de mettre en commun leurs observations.



Finalement, c'est peut être la Science elle-même dans son ensemble qui est en retard ; subordonnée à la recherche de crédits, au manque de communication, à la compétition excessive, à l'intellectualisation à outrance et au manque de bon sens, elle ressemble parfois plus à une religion sectaire et dogmatique qu'à ce qu'elle devrait être : une approche raisonnable et objective des lois Naturelles. Elle est aussi souvent victime de l'idée reçue qu'elle véhicule la Vérité, si elle n'est la Vérité elle-même ; or la Science n'est pas une vérité révélée, elle n'est que le reflet pour une époque donnée, pour une civilisation donnée, de la façon dont l'homme perçoit et définit son environnement ; ses lois et ses vérités évoluent au cours du temps. Une nouvelle approche serait donc peut-être à définir, il serait salvateur qu'une nouvelle Science plus Humaine, plus holistique voie le jour ; une Science finalement véritablement au service de l'Homme et de la Nature.

*Que signifie commercer avec la Nature  
si nous n'avons à faire, par la voie analytique,  
qu'à ses parties matérielles,  
si nous ne percevons pas la respiration de l'Esprit  
qui donne un sens à chaque partie  
et corrige ou sanctionne chaque écart  
par une loi toute intérieure ?*

La métamorphose des plantes  
Goethe



# **BIBLIOGRAPHIE**





AHEL M., GIGER W., KOCH M., 1994, Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment, *Water Res*, **28**, 1131-1142.

ALLEN E., DOISY E. A., 1923, An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals, *JAMA*, **81**, 819-821.

ALZIEU C., 2001, Environmental problems caused by TBT in France : assessment, regulations, prospects, *Mar. Envir Res*, **32**, 7-18.

ANDERSEN H. R., ANDERSSON A. M., ARNOLD S. F., AUTRUP H., BARFOED M., BERESFORD N. A., 1999, Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals, *Environ Health Perspect*, **107**, 89-108.

Anonymous, 1997, APE producers offering data, cooperation, *Inform*, **8**, 1269-1279.

ARUKWE A., CELIUS T., WALTHER B. T., GOKSØYR A., 1998, Plasma levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-nonylphenol and *o,p'*-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Mar Environ Res*, **46**, 133-136.

ASHFIELD L. A., POTTINGER T. G., SUMPTER J. P., 1998, Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index, *Environ Toxicol Chem*, **17**, 679-686.

ASTWOOD E.B., 1938, A six hour assay for the quantitative determination of estrogen, **23**, 25-31.

AUGER J., KUNSTMANN J.M., CZIGLIK F., JOUANNET P., 1995, Decline in semen quality among fertile men in Paris during past two years. *New Engl. J. Med.*, **332**, 281-285.

BALAGUER P., TEROUANNE B., LACOSTE C., PILLON A., GEORGET V., BOUSSIOUX A. M., 2001, Méthodes de détection de substances chimiques interférant avec les réponses endocrines : application à l'environnement, *Revue Française des Laboratoires*, **336**, 47-52.

BANAT F. A., PRECHTL S., BISCHOF F., 2000, Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge contaminated with 4-nonylphenol, *Chemosphere*, **41**, 297-302.

BARBER L.B. II, THURMAN E.M., SCHROEDER M.P., LEBLANC D.R., 1988, Long term fate of organic micropollutants in sewage-contaminated groundwater. *Environ. Sci. Technol*, **22**, 205-211.

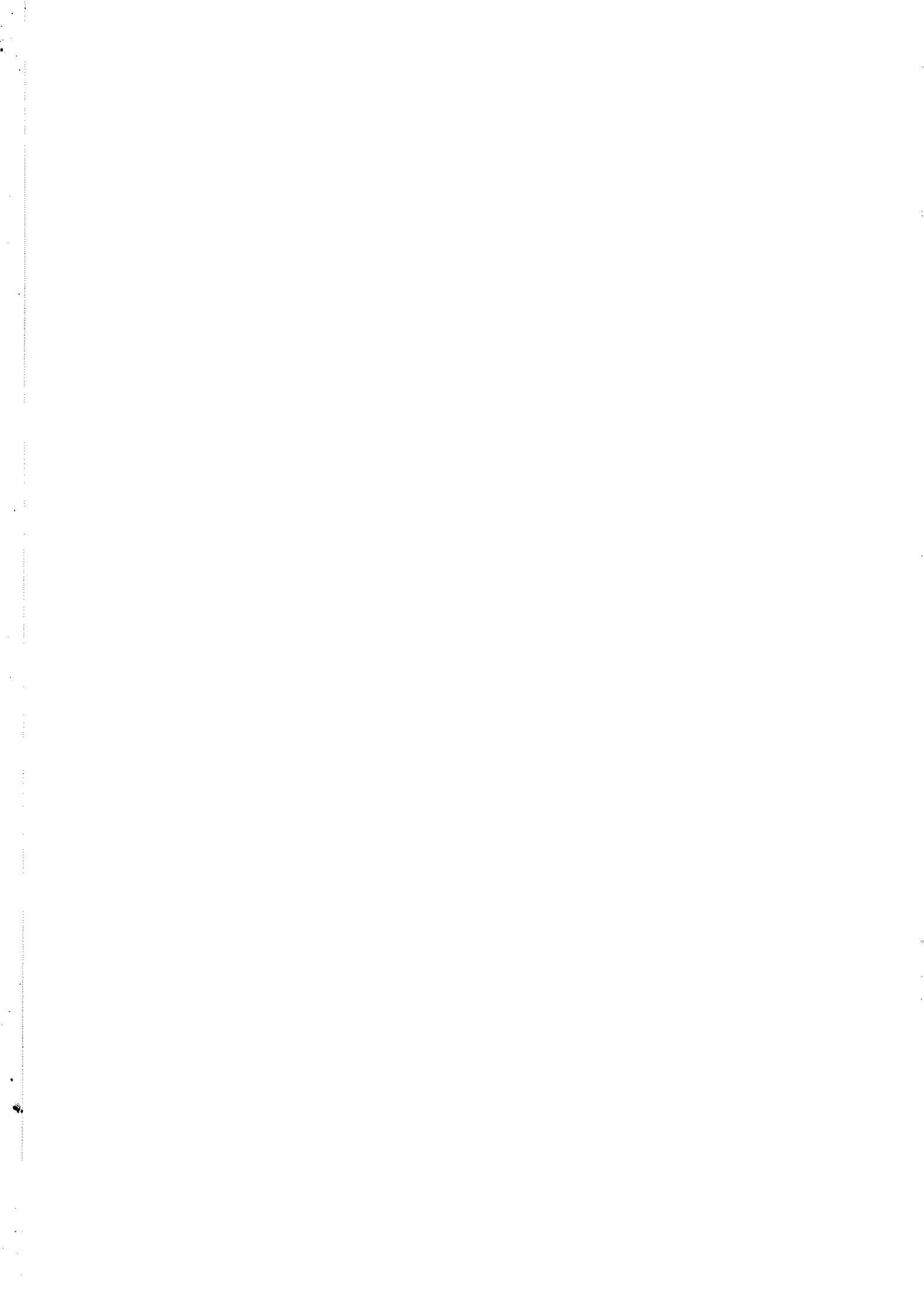
BENNETEAU-PELISSERO C., KAUSHIK S., SUMPTER J., FOSTIER A., LE GAC F., VALOTAIRE Y., DAVAIL-CUISSET, LE MENN F., 1998, Effets du soja et des phyto-oestrogènes sur la vitellogenèse et l'endocrinologie stéroïdienne de la truite arc-en-ciel et de l'esturgeon sibérien. Approches *in vivo* et *in vitro*, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 350-351, 571-583.

BENNIE D. T., 1999, Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates, *Water Qual Res J Canada*, **34**, 79-122.





- BLACKBURN M. A., KIRBY S. J., WALDOCK M. J., 1999, Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries, *Mar Pollut Bull*, **38**, 109-118.
- BOKERN M. and HARMS H., 1998, Toxicity, uptake and metabolism of 4-n-Nonylphenol in root cultures and intact plants under septic and aseptic conditions. *Env. Sci. & Pollut. Res.*, **5(1)**, 21-27.
- BOKERN M. and HARMS H., 1997, Toxicity and metabolism of 4-n-Nonylphenol in cell suspension cultures of different plant species. *Environ. Pollut.*, **79**, 243-248.
- BOOBIS A.R., McKILLOP D., ROBINSON T., ADAMS D.A., Mc CORMICK D.J., 1998, Interlaboratory comparison of the assessment of P450 activities in human hepatic microsomal samples, *Xenobiotica*, **28**, 493-506.
- BOKERN M., NIMTZ M. and HARMS H., 1996, Metabolites of 4-n-Nonylphenol in wheat suspension cultures. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1123-1127.
- BROMAGE N., CUMRANATUNGA R., 1988, Egg production in the rainbow trout, *Recent advances in aquaculture*, **3**, 63-138.
- BURDOF A., NIEUWENHUIJSEN M. J., 1999, Endocrine disrupting chemicals and human reproduction : Fact or Fiction?, *Ann Occup Hyg*, **43**, 435-437.
- CARLSEN E., GIWERCMAN A., KEIDING N., SKAKKEBAEK N., 1992, Evidence for the decreasing quality of semen during the past 50 years, *Br. Med. J.*, **305**, 609-615.
- CELIUS T. And WALTHER B.T., 1998, Differential sensitivity of zonagenesis and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to DDT pesticides, *J. Exp. Zool.*, **281**, 346-353
- CHATARD J., 1999 Disrtibution et métabolisation du 4-n-Nonylphénol chez la carotte (*daucus carota* L.), Rapport de stage/ DEA National de Toxicologie, I.N.R.A. Laboratoire des Xénobiotiques, Toulouse.
- COLBORN T., VOM SAAL F. S., SOTO A. M., 1993, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ Health Perspect*, **101**, 378-384.
- COLDHAM N. G., DAVE M., SIVAPATHASUNDRAM S. MCDONNELL D. P., CONNOR C., SAUER M. J., 1997, Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay, *Environ Health Perspect*, **105**, 734-742.
- Comitte on Hormonally Active Agents in the Environment, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Resarch Council. Hormonally active agents in the environnement, 2000, *National Academy Press*.
- COPELAND P. A., SUMPTER J. P., WALKER T. K., CROFT M., 1986, Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle, *Comp Biochem Physiol B*, **83**, 487-493.



- CREWS D., WILLINGHAM E., SKIPPER J. K., 2000, Endocrine disruptors : present issues, future directions, *Quater Rev Biol*, **75**, 243-260.
- CRISP T. M., CLEGG E. D., COOPER R. L., WOOD W. P., ANDERSON D. G., BAETCKE K.P., 1998, Environmental endocrine disruption : An effects assessment and analysis, *Env Health Pespec*, **106**, 11-55.
- CUNNY H. C., MAYES B. A., ROSICA K. A., TRUTTER J. A., VAN MILLER J.-P., 1997, Subchronic toxicity (90-day) study with *para*-nonylphenol in rats, *Regul Toxicol Pharmacol*, **26**, 172-178.
- DAMGAARD I. N., MARIA K., TOPPARI J., SKAKKEBAEK N. E., 2002, Impact of exposure to endocrine disrupters *in utero* and in childhood on adult reproduction, *Res Clin Endocrin Met*, **12**, 289-309.
- DAMSTRA T., BARLOW S., BERGMAN A., KAVLOCK R., VAN DER KRAAK G. (editors), 2002, Global Assessment of the State-of-the Science of Endocrine Disruptors. *International Program on Chemical Safety*, Chap 2.
- DE JAGER C., BORNMAN M. S., OOSTHUIZEN M. C., 1999. II. The effects of *p*-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure, *Andrologia*, **31**, 107-113.
- DE JAGER C., BORNMAN M. S., VAN DER HORST G., 1999, I. The effect of *p*-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats, *Andrologia*, **31**, 99-106.
- DEL RIO-GOMEZ I., MARSHALL T., TASI P., SHAO Y.S., GUO S.L., 2002, Number of boys born to men exposed to polychlorinated byphenyls, *Lancet*, **360**, 143-144.
- DEGEN G. H., BOLT H. M., 2003, Comments on "endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food", *Environ Sci Technol*, **37**, 2622-2623.
- DEGEN G. H., BOLT H. M., 2000, Endocrine disruptors : update on xenoestrogens, *Int. Arch. Occup. Environ Health*, **73**, 433-441.
- DEPLEDGE M. H., BILLINGHURST Z., 1999, Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates, *Mar Pollut Bull*, **39**, 32-38.
- DÜRING R.-A., KRAHE S., GÄTH S., 2002, Sorption behavior of nonylphenol in terrestrial soils, *Environ Sci Technol*, **36**, 4052-4057.
- EKELUND R., GRANMO A., MAGNUSSON K., BERRGREN M., BERGMAN A., 1993, Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment, *Environ. Pollut.*, **79**, 59-61.
- FIELD J. A., REED R. L., 1996, Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants in U. S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluents, and river waters, *Environ Sci Technol*, **30**, 3544-3550.



FRY D. M., TOONE C. K., SPEICH S. M., PEARD R. J., 1987, Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: demographic and toxicological considerations, *Stud Avian Bio*, **10**, 26-43.

FRY D. M. and TOONE C.K., 1981, DDT-induced feminisation of gull embryos, *Science*, **231**, 919-924.

FUJII K., YAMAMOTO R., TANAKA T., HIRAKAWA T., KIKUCHI S., 2003, Potential of a new biotreatment: *Sphingomonas cloacae* S-3(T) degrades nonylphenol in industrial wastewater, *J Ind Microbiol Biotechnol*.

GAIDO K. W., MACDONNELL D. P., SAFE S., 2001, *In vitro* methods for characterizing chemical interactions with steroid hormone receptors, in *The Handbook of Environmental Chemistry*, part **1**, 27-32.

GEJLSBERG B., KLINGE C., SAMSOE-PETERSEN L. MADSEN T., 2001, Toxicity of linear alkylbenzene sulfonates and nonylphenol sludge amended soil, *Environ Toxicol Chem*, **20 (12)**, 2709-2727.

GIGER W., BRUNNER P. H., SCHAFFNER C., 1984, 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science*, **225**, 623-625.

GIMENO S., KOMEN H., GERRITSEN A. G. M., BOWMER T., 1998, Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during sexual differentiation, *Aquat Toxicol*, **43**, 77-92.

GIMENO S., KOMEN H., JOBLING S., SUMPTER J., BOWMER T., 1998, Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during spermatogenesis, *Aquat Toxicol*, **43**, 93-109.

GOLDEN R.J., NOLLER K.L., TITUS-ERNSTOFF L., KAUFFMAN R.H., MITTENDORF R., STILLMAN R., REESE E.A., 1998, Environmental endocrine modulators and human health : an assessment of the biological evidence, *Crit. Rev. Toxicol.*, **28**, 109-227.

GRAY L.E, OSTBY J., WILSON V., LAMBRIGHT C.... TIETGE J.E., ANKLEY G.T., 2002, Xenoendocrine disruptors-tiered screening and testing, *Toxicology*, **27**, 371-382.

GRAY L.E., KELCE W.R., WIESE T, TYL R., GAIDO K., COOK J., KLINEFELTER G., DESAULNIERS D., WILSON E., ZACHAREWSKI T., 1997, Endocrine screening methods workshop report : detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act *viareceptor* or steroidogenic enzyme mechanisms, *Reprod. Toxicol*, **11**, 719-750.

GUARDIOLA A., VENTURA F., MATIA L., CAIXACH J., RIVERA J., 1991, Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of volatile organic compounds in Barcelona tap water, *J. Chromatogr A*, **562**, 481-492.

GUENTHER K., HEINKE V., THIELE B., KLEIST E., PRAST H., RAECKER T., 2003, Response to comments on "endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food", *Environ Sci Technol*, **37**, 2624.



GUENTHER K., HEINKE V., THIELE B., KLEIST E., PRAST H., RAECKER T., 2002, Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food, *Environ Sci Technol*, **36**, 1676-1680.

GUILLETTE L.J. Jr, CRAIN D.A., ROONEY A.A., PICKFORD D.B., 1995, Organization versus activation : the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife, *Environ. Health. Perspec.*, **103** (S7), 157-164.

GUILLETTE L.J. Jr, GROSS T.S., MASSON G.R., MATTER J.M., PERCIVAL H.F., WOODWARD A.R., 1994, Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, *Environ. Health Perspect.*, **102** (8), 680-688.

GUNDERSEN J. L., 2001, Separation of isomers of nonylphenol and select nonylphenol polyethoxylates by high-performance liquid chromatography on a graphitic carbon column, *J Chromatogr A*, **914**, 161-166.

GUZELIAN P. S., 1982, Comparative toxicology of chlordecone (kepone) in humans and experimental animals, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **22**, 89-113.

HARRISON P., HOLMES P., HUMFREY C., 1997, Reproductive health in humans and wildlife : are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Science of the Total Environment*, **205**, 97-106.

HEINISL J., KNUTH M.L., LIBER K., SHEEDY B.R., TUNELL R.L., ANKLEY G.T., 1999, Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures, *Environ. Toxicol. Chem.*, **18** (3), 363-375.

HERBST A.L., ULFELDEN H., POSKANZER D.C., 1971, Adenocarcinoma of the vagina : Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, *New Engl. J. Med.*, **284**.

HESSELSØE M., DENNIS J., SKALS K., OLESEN T., MOLDRUP P., ROSLEV P., MORTENSEN G. K., HENRIKSEN K., 2001, Degradation of 4-nonylphenol in homogeneous mixtures of soil and sewage sludge, *Environ Sci Technol*, **35**, 3695-3700.

HIRSCH K.S., WEAVER D.E., BLACK L.J., FALCONE J.F., MacLUSKI N.J., 1987, Inhibition of central nervous system aromatase activity : a mechanism of fenarimol-induced infertility in the male rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **91**, 235-245.

INOUE K., KONDO S., YOSHIE Y., KATO K., YOSHIMURA Y., HORIE M., NAKAZAWA H., 2001, Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods, *Food Addit contam.*, **18**, 157-164.

JOBLING S., 1998, Review of suggested testing methods for endocrine-disrupting chemicals, *Pure Appl Chem*, **70**, 1805-1827.

JOBLING S., SHEAHAN D., OSBORNE J. A., MATTHIESSEN P., SUMPTER J. P., 1996, Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environ Toxicol Chem*, **15**, 194-202.





JOBLING S., SUMPTER J. P., 1993, Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquat Toxicol*, **27**, 361-372.

JOUANNET P., WANG C., EUSTACHE F., KOLD-JENSEN T., AUGER J., 2001, Semen quality and male reproductive health, the controversy about human sperm decline, *APMIS*, **109**, 333-344.

JUBERG D. R., 2000, An evaluation of endocrine modulators : Implications for human health, *Ecotox Env Safe*, **45**, 93-105.

JUNK G.A., SVEC H.J, VICK R.D, AVERY M.J, 1974, Contamination of water by synthetic polymer tubes, *Environ. Sci. Technol.*, **8**, 1100-1106.

KAVLOCK R.J, 1996, Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors : A review of the US-EPA sponsored workshop, *Env Health Perspect*, **104**, 715-740.

KIM Y.S., KATASE T., SEKINE S., INOUE T., MAKINO M., UCHIYAMA T., FUJIMOTO Y., YAMASHITA N., 2004, Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography, *Chemosphere*, **54**, 1127-1134.

KITAMURA S., JINNO N., OHTA S., KUKORI H., FUJIMOTO N., 2002, Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphénol A and tetrachlorobisphénol A, *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 554-559.

KOHNO H., GANDINI O., CURTIS S. W., KORACH K. S., 1994, Anti-estrogen activity in the yeast transcription system : estrogen receptor mediated antagonist response, *Steroids*, **59**, 572-578.

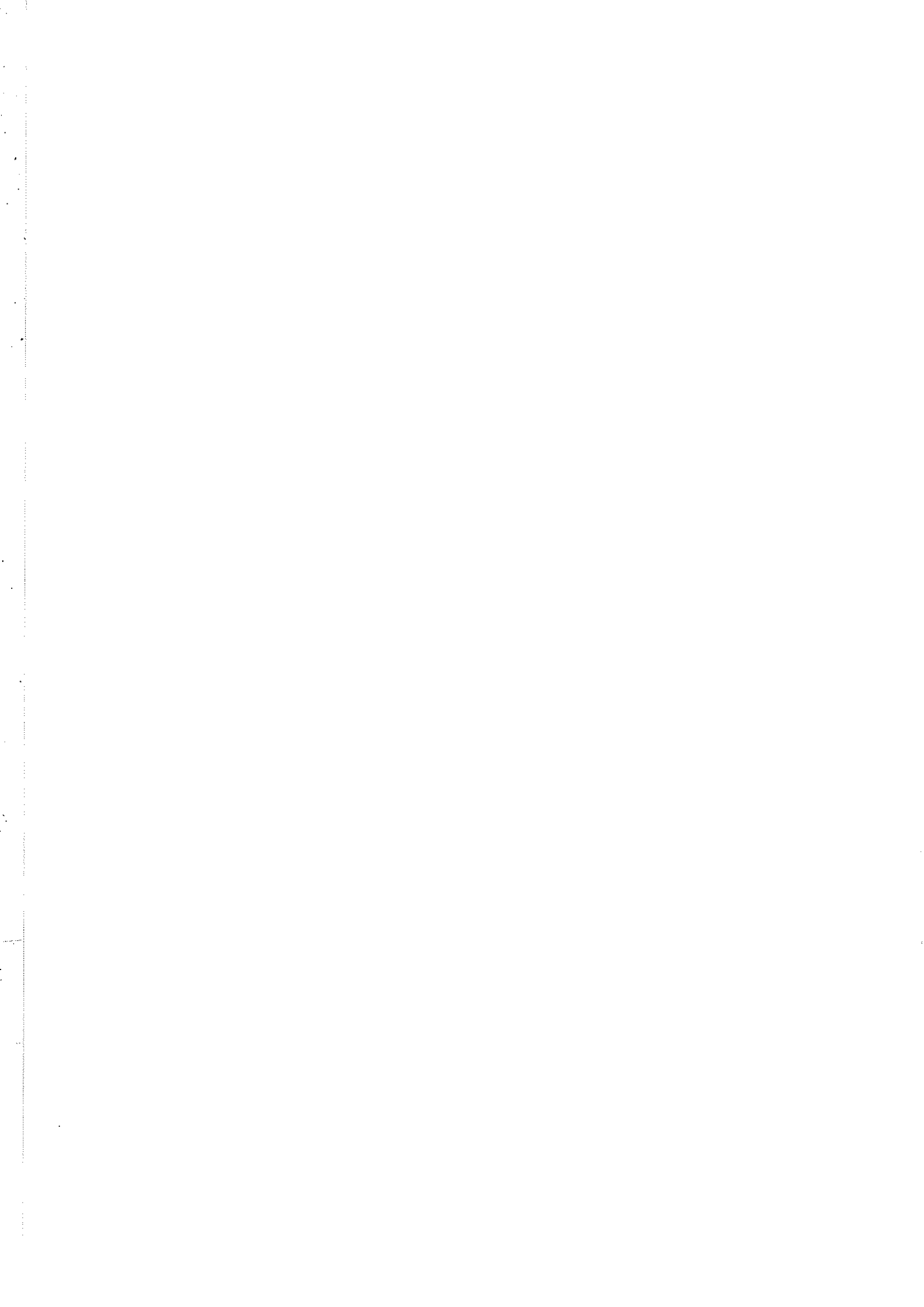
KOLLMANN A., BRAULT A., TOUTON I., DUBROCA J., CHAPLAIN V., MOUGIN C., 2003, Effect of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils, *J. Environ Qual*, **32**, 1269-1276.

KUIPER-GOODMAN T., SCOTT P.M., WATANABE H., 1987, Risk assesment of the mycotoxin zéaralénone, *Regul. Toxicol. Pharm.*, **7**, 253-306.

LABOUREAU-SOARES BARBOSA S., 2004, Thyroïde : risques professionnels et environnementaux, *Med. Clin. Endocrinologie et diabète*, **HS**, 49-55.

LEE Y.H., HOWE R.S., SHA S.J., TEUSCHER C., SHEEHAN D.M., LYTTLE C.R., 1989, Estrogen regulation of an eosinophilic chemotactic factor in the immature rat uterus. *Endocrinology*, **125**, 3022-3028.

LITZ N., MÜLLER-WEGENER U., 1998, The influence of surfactants applied by sewage sludge on the behaviour of atrazine and PAHs in semiarid soils, *Z Pflanz Bodenk*, **61**, 255-259.



LOOMIS A.K., THOMAS P., 1999, Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis : different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER., *Biol. Reprod.*, **61**, 51-60.

MAGUIRE R. J., 1999, Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments, *Water Qual Res J Canada*, **34**, 37-78.

MAMBRINI M, ROEM A.J., CRAVEDI J.P., LALLES J.P., KAUSHIK S.J., 1999, Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, *J. Anim. Sci.*, **77**, 2990-2999.

MARCOMINI A., PAVONI B., SFRISO A., ORIO A. A., 1990, Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment, *Mar Chem*, **29**, 307-323.

MARKEY C. M., MICHAELSON C. L., SONNENSCHNEIN C., SOTO A. M., 2001, Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens, In *the Handbook of environmental chemistry* vol. 3, Part L endocrine disruptors, Part I, M. Metzler ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 131-153.

MARKEY C. M., RUBIN B. S., SOTO A. M., SONNENSCHNEIN C., 2003, Endocrine disruptors : from Wingspread to environmental developmental biology, *J. Ster Biochem*, **83**, 235-244.

MATHEW R., KACEW S., KHAN S. U., 1998, Bioavailability in rats of bound pesticide residues from tolerant or susceptible varieties of soybean and canola treated with metribuzin or atrazine, *Chemosphere*, **36**, 589-596.

MEERTS I. A., ASSINK Y., CENIJIN P. H., WEIJERS B. M., VAN DEN BERG H. H. J., BERGMAN A., BROUWER A., 2000, Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*, *Toxicological Sciences*, **56**, 95-104.

MÜLLER S., SCHMID P., SCHLATTER C., 1998, Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans, *Env. Tox. And Pharmacol.*, **5**, 257-265.

NAGAO T., WADA K., MARUMO H., YOSHIMURA S., ONO H., 2001, Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study, *Reprod Toxicol*, **15**, 293-315.

NAGEL S. C., VOM SAAL F. S., WELSHONS W. V., 1998, the effective free fraction estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays : Physiology of delivery modifies estrogenic activity, *Proc soc Exp Biol Med*, **217**, 300-309.

NAYLOR C. G., 1995, Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates, *Text Chem Color*, **27**, 29-33.

NAYLOR C. G., MIEURE J. P., ADAMS W. J., WEEKS J. A., CASTALDI F. J., OGLE L. D., ROMANO R. R., 1992, Alkylphenol ethoxylates in the environment, *J Amer Oil Chemists Soc*, **69**, 695-703.



ODUM J., LEFEVRE P. A., TITTENSOR S., PATON D., HARRIS C. A., BERESFORD N. A., SUMPTER J. P., ASHBY J., 1997, The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonylphenol, and comparison with a yeast estrogenicity assay, *Regul Toxicol Pharmacol*, **25**, 176-188.

OLSEN G.W., BODNER K.M., RAMLOW J.M., ROSS C.E., LIPSCHULTZ L.I., 1995, Have sperm counts been reduced 50% in 50 years? A statistical model revisited, *Fertil. Steril.*, **63**, 887-893.

PASCAL-LORBER S., RATHAHAO E., CRAVEDI J.-P., LAURENT F., 2003, Uptake and metabolic fate of [<sup>14</sup>C]-2,4-dichlorophenol and [<sup>14</sup>C]-2,4-dichloroaniline in wheat (*Triticum aestivum*) and soybean (*Glycine max*), *J Agr food Chem*, **51**, 4712-4718.

PICARD K., 2000, Recherche *in vitro* d'effets oestrogénomimétiques de xénobiotiques (phtalates, bisphénols, alkylphénols) et relation métabolisme activité. Thèse d'université, Université de Bourgogne.

PILLIERE F., 2002, Perturbateurs endocriniens et risques professionnels, *Documents pour le médecin du travail*, **92**.

PREZIOSI P., 1998, Endocrine disruptors as environmental signalers : an introduction, *Pure & Appl Chem*, **70**, 1617-1631.

PROUILLAC C., 2003, Retardateurs de flamme bromés et perturbation des équilibres endocriniens : métabolisme comparé *in vitro* du tetrabromobisphénol A chez l'homme et chez le rat, Thèse d'exercice, Université Bordeaux 2, 83.

REN L., MARQUARDT M.A., LECH J.J., 1997, Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells MCF-7, *Chemico-Biological Interactions*, **104**, 55-64.

ROUTLEDGE E.J. and SUMPTER J.P., 1997, Structural features of alkylphenolic chemicals associated with oestrogenic activity, *J. Biol. Chem.*, **272**, 3280-3288.

SAKAI H., YAMADA-OKABE T., KASHIMA Y., MATSUI M., AONO T., AOYAGI M., HASEGAWA J., 2003, Effects of brominated flame retardants on transcriptional activation mediated by thyroid hormone receptor, *Organ Comp*, **61**, 215-218.

SAMUELSEN M., OLSEN C., HOME J. A., MEUSSEN-ELHOLM C., BERGMANN A., HONGSLO J. K., 2001, Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in MCF-7 human breast cancer cell line, *Cell Biol & Toxicol*, **17**, 139-151.

SCOTT-FORDSMAND J. J. and KROGH P. H., 2003, The influence of application form on the toxicity of nonylphenol to *Folsomia Candida* (Collembola : Isotomidae), *Ecotoxicology and Safety*, **58** (3), 294-299.

SCHANTZ S.L., GASIOR D.M., POLVEREJAN E., McCAFFREY R.J., SWEENEY A.M., HUMPHREY H.E., GARDINER J.C., 2002, Impairments of memory and learning in older



adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish, *Environ Health Perspect*, **109** (6), 605-611.

SHARPE R. M., 1998, Environmental estrogens and male infertility, *Pure & Appl Chem*, **70**, 1685-1701.

SHARPE R. M., 1993, Declining sperm counts in men: is there an endocrine cause?, *J Endocrinol*, **136**, 357-360.

SHARPE R. M., SKAKKEBAEK N. E., 1993, Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet*, **341**, 1392-1395.

SHURIN J. B., DODSON, S. I., 1997, Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia Magna*, *Environ Toxicol Chem*, **16**, 1269-1276.

SINGER P. L., 1949, Occupational oligospermia, *JAMA-J Am Med Assn*, **140**, 1249.

SKAKKEBAEK N. E., RAJPERT – DE MEYTS E., MAIN K. M., 2001, Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects, *Human Reproduction*, **16**, 5, 972-978.

SMITH J.E., LEWIS C.W., ANDERSON J.G., SOLOMONS G.L., 1994, Mycotoxins in human nutrition and health. European Commission Directorate-General XII, Science, Research and development, EUR, 16048, EN.

SOLOMON G. M., SCHETTLER T., 2000, Endocrine disruption and potential human health implications, *CMAJ*, **163**, 1471-1476.

SONNENSCHNEIN C. And SOTO A.M., 1998, An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroi. Biochem. Mol. Biol.*, **65**, 143-150.

SOTO A.M., LIN T.M., JUSTICIA H., SILVIA R.M., SONNENSCHNEIN C., 1992, An „in culture“ bioassay to assesses the estrogenicity of xenobiotics. In *Chemically induced alterations in sexual development*, Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, pp. 295-309.

SOTO A. M., JUSTICIA H., WRAY J. W., SONNENSCHNEIN C., 1991, p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ Health Perspect*, **92**, 167-173.

SOTO A. M., SONNENSCHNEIN C., 1985, The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7), *J. Steroid Biochem*, **23**, 87-97.

STOLZENBERG G. E., OLSON P. A., ZAYLSKIE R. G., MANSAGER E. R., 1982, Behavior and fate of ethoxylated alkylphenol nonionic surfactant in barley plants. *J Agr Food Chem*, **30**, 637-644.

SUMPTER J. P., JOBLING S., 1995, Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of aquatic environment, *Environ Health Perspect*, **103**, 173-178.





SUOMINEM J. And VIERULA M., 1995, Semen quality of Finnish men, *Brit. Med. J.*, **306**, 157-159.

SWAN S.H. and VOM SAAL F.S, 2002, Alterations in male reproductive development : the role of endocrine disrupting chemicals, in *The Handbook of Environmental Chemistry Vol.3 part M, Endocrine disruptors, part II*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

SWENSON E.S., MILISEN W.B., CURATOLO W., 1994, Intestinal permeability enhancement : structure-activity and structure toxicity relationships for nonylphenoloxypolyoxyethylene surfactant permeability enhancers, *Pharmacol. Res.*, **11**, 1501-1504.

TABAK H.H., BUNCH R.L., 1970, Steroid hormones as water pollutants I, *Develop. Industr. Microbiol.*, **11**, 367-376.

THIBAUT R., 2001, Etude chez le poisson et les organismes aquatiques du devenir métabolique d'un composé oestrogénique, le nonylphénol, Thèse de doctorat, N° 2358, université Bordeaux 1.

THIBAUT R., JUMEL A., DEBRAUWER L., RATHAHAO E., LAGADIC L., CRAVEDI J.-P., 2000, Identification of 4-n-nonylphenol metabolic pathways and residues in aquatic organisms by HPLC and LC-MS analyses, *Analisis*, **28**, 793-801.

THIBAUT R., DEBRAUWER L., RAO D. and CRAVEDI J. P., 1998, Disposition and metabolism of [3H]-4-n- NP in rainbow trout, *Mar. Environ. Res.*, **46**, 521-524.

TIETGE J.E., ANKLEY G.T., DEGITZ S.J., 2000, Report on the Xenopus tail Resorption assay as a tier 1 Screen for thyroid active chemicals, Mid-Continent Ecology Division, USEPA, Duluth, MN.45.

TOPP E., STARRATT A., 2000, Rapid mineralization of the endocrine-disrupting chemical 4-nonylphenol in soil, *Environ Toxicol Chem*, **19**, 313-318.

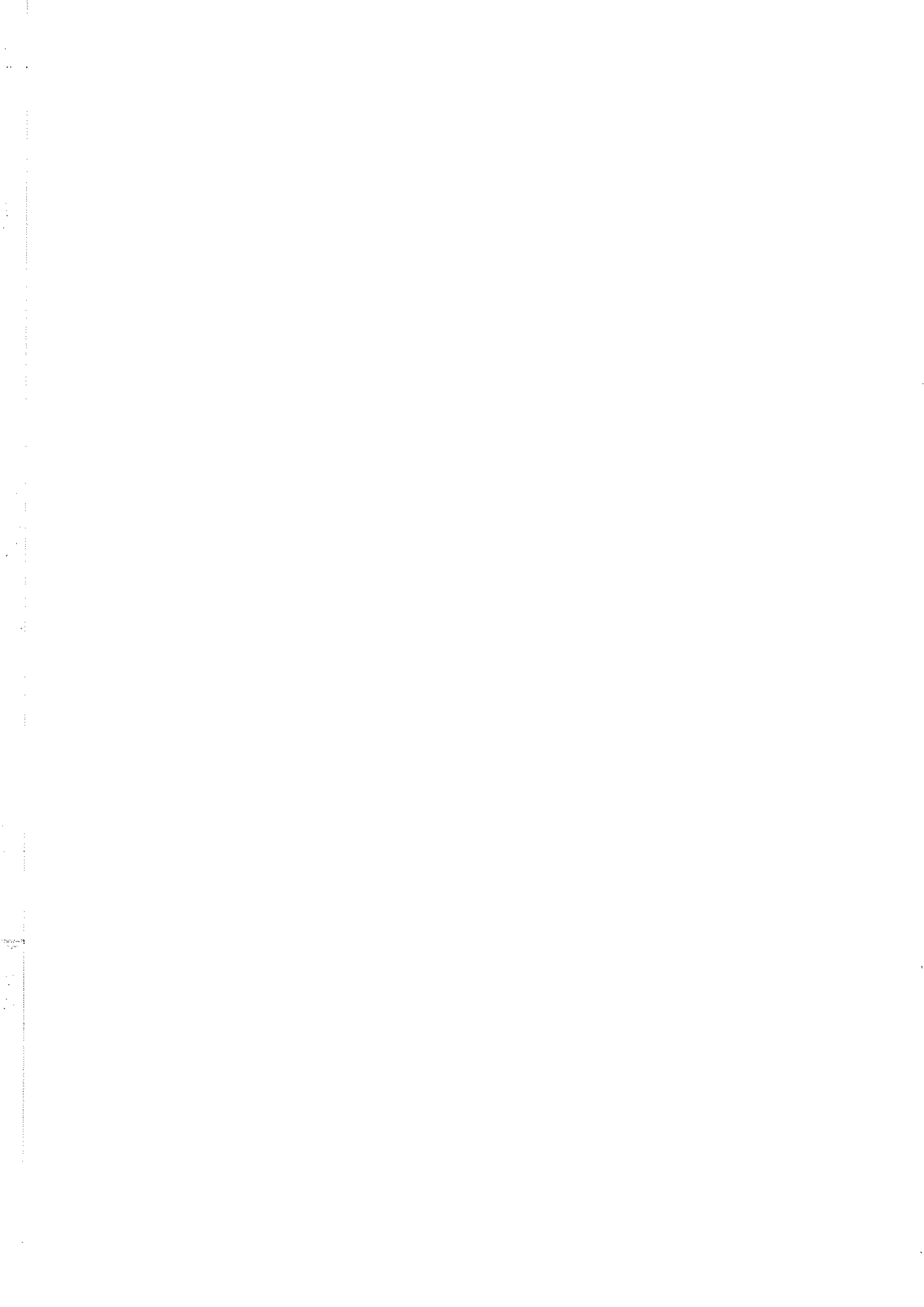
TOPPARI J., LARSEN J.C., CHRISTIANSEN P..... SUMPTER J.P., SKAKKEBAEK N.E., 1996, Male reproductive health and environmental estrogens, *Environ. Health. Perspec.*, **104** (S4), 741-803.

TYLER C. R., JOBLING S., SUMPTER J., 1998, Endocrine disruption in wildlife : A critical review of the evidence, *Criticals reviews in toxicology*, **28**, 319-361.

VIKELSØE J., THOMSEN M., CARLSEN L., 2002, Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils, *Sci Total Environ*, **296**, 105-116.

WEIGEL N.L., ZHANG Y.X., 1998, Ligand-independant activation of steroid hormone receptors, *J. Mol. Med.-JMM*, **76** (7), 469-479.

WELSONS W. V., JUDY B. M., NAGEL S. C., TAYLOR J. A., VOM SAAL F. S., 1997, Receptor occupancy and response to estradiol and xenoestrogens in MCF-7 cells, presented at the Estrogens and Environmental Meeting, Bethesda.



WHITE R., JOBLING S., HOARE S. A., SUMPTER J. P., PARKER M. G., 1994, Environmental persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology*, **135**, 175-182.

YAOITA Y., NAKAJIMA K., 1997, Induction of apoptosis and CPP32 expression by thyroid hormone in a myoblastic cell line derived from tadpole tail, *J. Biol. Chem*, **272**, 5122-5127.

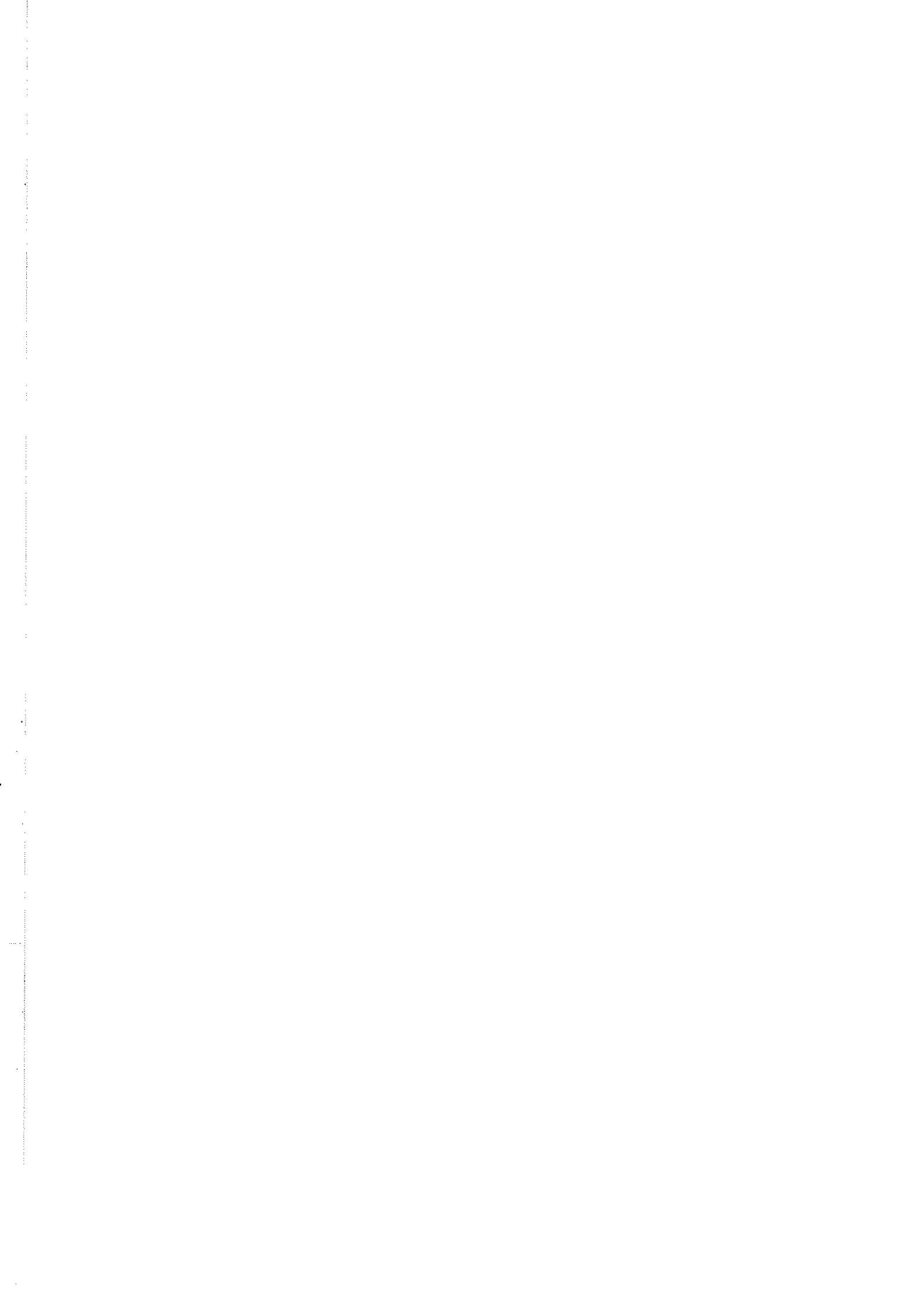
YOU H. J., CHOI C. Y., JEON Y. J., CHUNG Y. C., KANG S. K., HAHM K.-S., JEONG H. G., 2002, Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by 4-nonylphenol in macrophages, *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 753-759.

ZACHAREWSKI T.R., MEEK M.D., CLEMONS J.H., WU Z.F., FIELDEN M.R., MATTHEWS J.B., 1998, Examination of the in vitro and in vivo oestrogenic activities of eight commercial phthalate esters, *Toxicol. Sci.*, **46**, 282-293.

ZALKO D., COSTAGLIOLA R., DORIO C., RATHAHAO E., CRAVEDI J.-P., 2002, *In vivo* metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in wistar rats, *Drug Metab Disposition*, **31**, 1-11.

ZHANG L., GIBBLE R., BAER K. N., 2003, The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*, *Ecotoxicol Environ Safety*, **55**, 330-337.

ZUMBADO M., BOADA L. D., TORRES S., MONTERDE J. G., DIAZ-CHICO B. N., AFONSO J. L., CABRERA J. J., BLANCO A., 2002, Evaluation of acute hepatotoxic effects exerted by environmental estrogens nonylphenol and 4-octylphenol in immature male rats, *Toxicology*, **175**, 49-62.



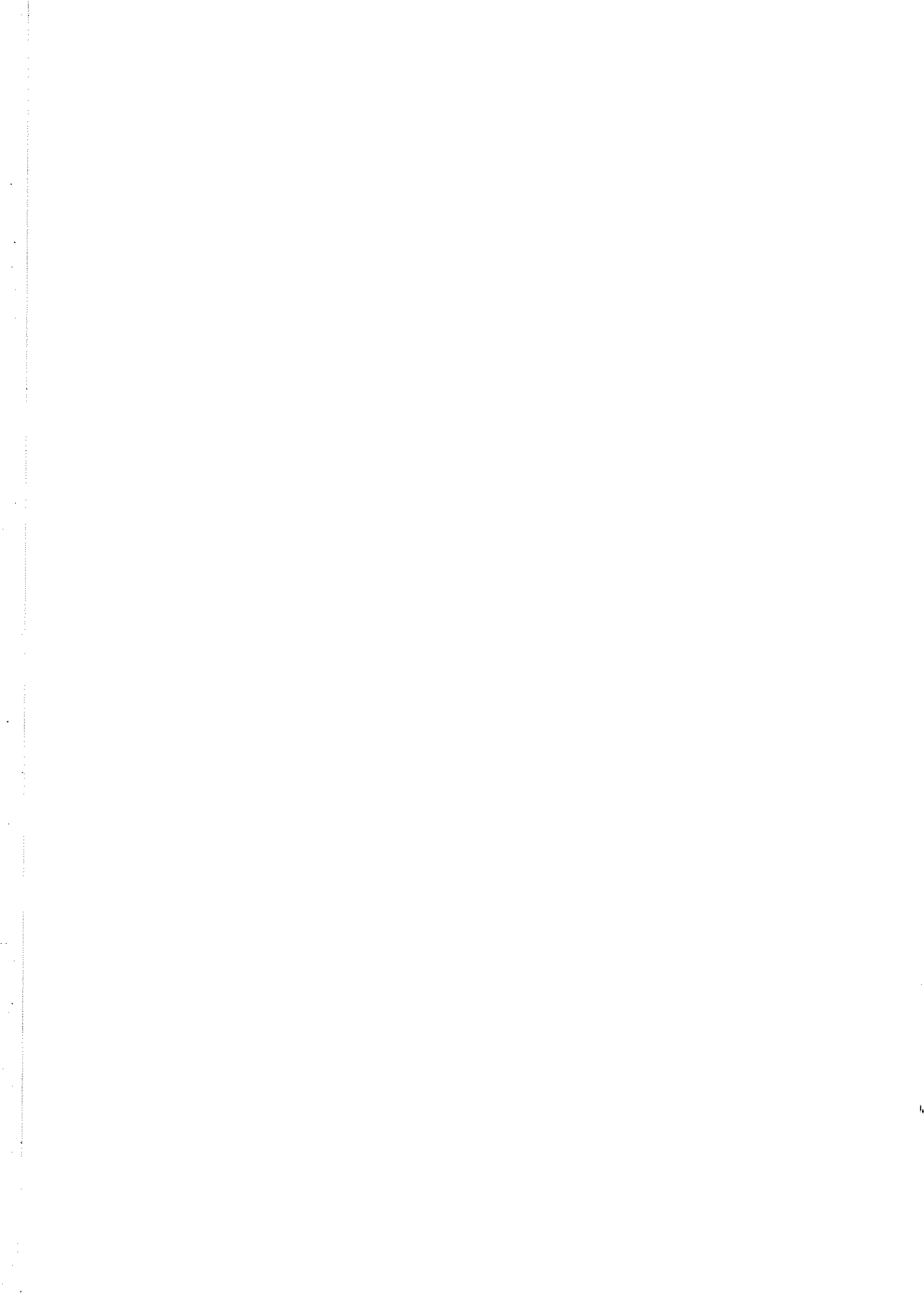
# Table des matières

<i>Remerciements</i>	5
<i>Liste des abréviations utilisées</i>	6
<i>Sommaire</i>	8
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>10</b>
<b><u>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b>	<b>14</b>
<b>I. Les perturbateurs endocriniens, introduction, définition</b>	<b>15</b>
1. Définitions	15
2. Historique et constat	16
3. L'hypothèse du TDS ou testicular dysgenesis syndrome	19
4. Exposition aux perturbateurs endocriniens et risques professionnels	20
<b>II. Revue des principaux perturbateurs endocriniens</b>	<b>21</b>
1. Les oestrogénomimétiques	21
1.1 Les oestrogènes synthétiques	22
1.2 Les composés oestrogéniques à visée thérapeutique	22
1.3 Les oestrogénomimétiques naturels	24
1.4 Les xéno-oestrogènes	24
1.4.1 Les pesticides organo-chlorés	24
1.4.2 Les polychlorodibenzodioxines et les polychlorodibenzofuranes	25
1.4.3 Les polychlorobiphényles	26
1.4.4 Les résines epoxy et les produits dérivés des polycarbonates	27
1.4.5 Les phtalates	27
1.4.6 Les alkylphénols	28
1.4.7 Les métaux	29
1.4.8 Les solvants	29
2. Les perturbateurs des autres systèmes hormonaux	30
2.1 Les perturbateurs du système thyroïdien	30
2.2 Perturbateurs des autres systèmes	31
<b>III. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens</b>	<b>32</b>
1. Mécanismes d'action directe des oestrogénomimétiques	33
1.1 Activation directe d'un récepteur	33

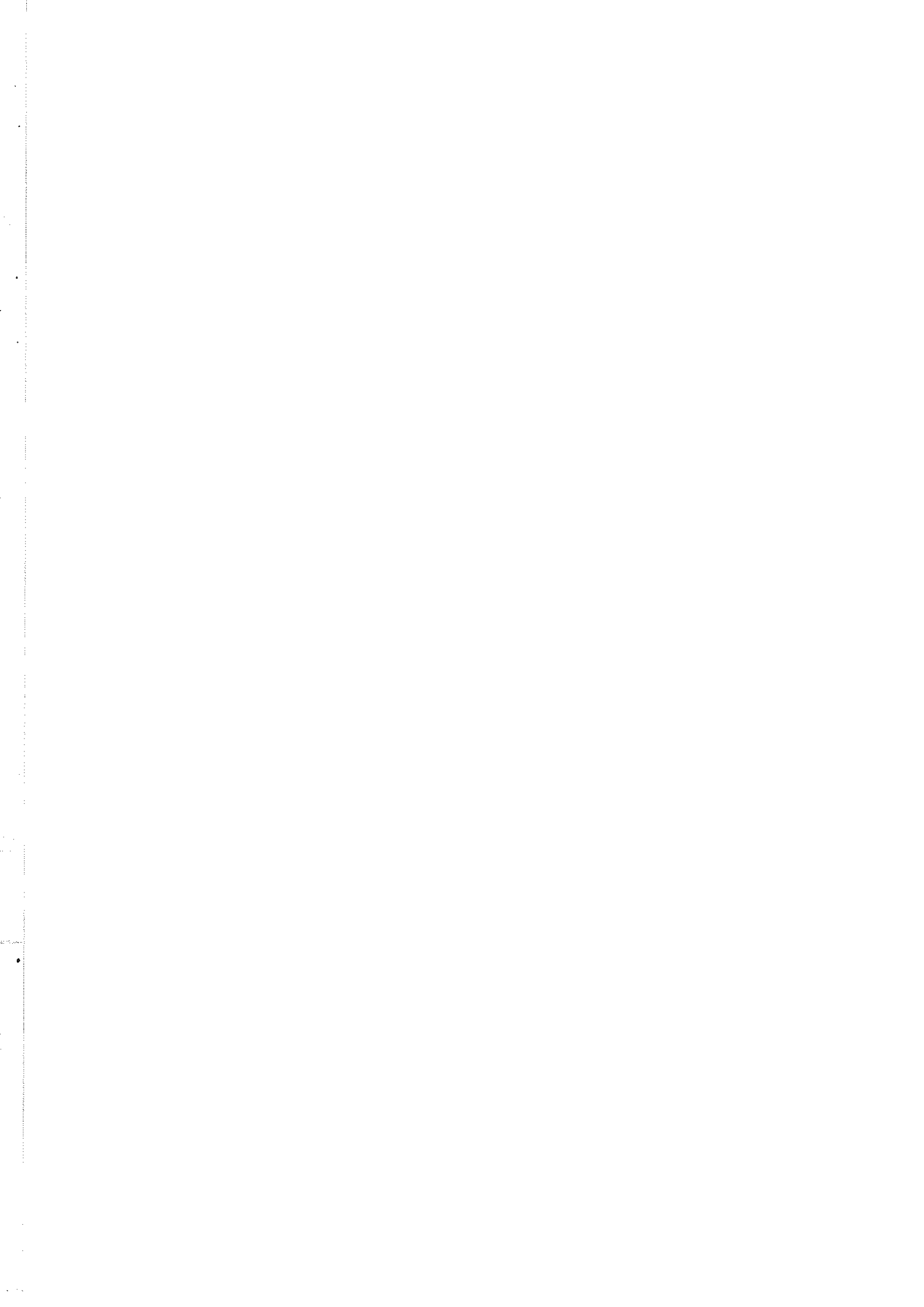


1.2 Blocage de la fixation du ligand à un récepteur	34
<b>2. Mécanismes d'action indirecte</b>	<b>34</b>
2.1 Altération de la synthèse des oestrogènes	34
2.2 Modification du transport des oestrogènes	35
2.3 Altération du métabolisme des oestrogènes	35
2.4 Atteinte des mécanismes de rétrocontrôle	35
2.5 Activation indépendante de la fixation du ligand	36
<b>IV. Relation structure-activité chez les perturbateurs endocriniens</b>	<b>37</b>
<b>V. Influence de l'âge et des phases du développement sur l'effet des perturbateurs endocriniens</b>	<b>39</b>
<b>VI. Peut-on parler d'une relation effet-dose pour les perturbateurs endocriniens ?</b>	<b>41</b>
<b>VII. Méthodes tests de l'activité hormonale des composés suspectés d'être des perturbateurs endocriniens</b>	<b>44</b>
<b>1. Tests <i>in vitro</i></b>	<b>45</b>
1.1 Test de liaison sur le récepteur oestrogénique	45
1.2 Test E-screen, test de prolifération cellulaire	46
1.3 Test de production des protéines	47
1.4 Test d'activation du récepteur aux oestrogènes	48
1.5 Expression des gènes naturels	49
<b>2. Tests <i>in vivo</i></b>	<b>49</b>
2.1 Test de la synthèse de vitellogénine chez le poisson mâle	50
2.2 Test de la puberté chez le rat	50
2.3 Test d'utérothrophie	51
2.4 Test de la cornification vaginale	51
2.5 Test de reproduction chez le poisson	51
<b>3. Comparaison des méthodes tests de l'activité oestrogénique</b>	<b>52</b>
<b><u>LE NONYLPHENOL, PRESENTATION</u></b>	<b>55</b>
<b>I. Le nonylphénol, présentation</b>	<b>56</b>
<b>II. Toxicité du nonylphénol</b>	<b>57</b>
<b>1. Sur les organismes aquatiques</b>	<b>57</b>
1.1 Toxicité aiguë	57
1.2 Toxicité à long terme, effets oestrogéniques	58





2. Sur les organismes végétaux	59
3. Chez les invertébrés terrestres	59
4. Chez les mammifères	60
4.1 Toxicité aigüe	60
4.2 Toxicité à long terme, effets oestrogéniques	60
<b>III. Des isomères à activité oestrogénique variable</b>	<b>61</b>
<b>IV. Pharmacocinétique et métabolisme du nonylphénol</b>	<b>62</b>
1. Sources possibles d'exposition au NP	61
2. Pharmacocinétique du nonylphénol chez l'homme	63
3. Métabolisme du NP chez le rat	64
<b>V. Rejet du nonylphénol dans l'environnement et sources de contamination</b>	<b>65</b>
1. Sources de contamination	65
2. Contamination de l'environnement aquatique	65
3. Les boues de STEP, principale source de contamination du milieu terrestre	66
4. Dégradation et rémanence du NP dans les sols	67
<b>VI. Objectifs de l'étude</b>	<b>68</b>
<b><u>PARTIE EXPERIMENTALE</u></b>	<b>69</b>
<b>Introduction</b>	<b>70</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>72</b>
<b>I. Matériel</b>	<b>72</b>
1. Matériel végétal	72
2. Solvants, enzymes et produits chimiques	72
3. Nonylphénol radiomarqué et non radiomarqué	73
4. Matériel analytique	73
4.1 Chromatographie liquide	73
4.2 Comptage de la radioactivité	74
<b>II. Méthodes analytiques</b>	<b>74</b>
1. Méthodes extractives	74
2. Méthodes séparatives	75
3. Hydrolyses enzymatiques et chimiques	75



<b>III. Protocoles expérimentaux</b>	<b>76</b>
1. Absorption et distribution du nonylphénol chez les plantes	76
1.1 Cultures hydroponiques	76
1.2 Cultures sur sol reconstitué	77
1.3 Etudes cinétiques de transfert du nonylphénol chez la plante	77
1.3.1 <i>Transfert chez le blé</i>	77
1.3.2 <i>Transfert chez le radis</i>	77
1.4 Amendement des sols par des boues de STEP	78
2. Détermination du métabolisme	78
2.1 Cultures de cellules de tabac	78
2.2 Feuilles excisées de blé	78
2.3 Contamination directe de plants par le nonylphénol	79
<b>Résultats et discussion</b>	<b>80</b>
<b>I. Etudes de métabolisme</b>	<b>80</b>
1. Métabolisme du nonylphénol dans les cellules de tabac	80
2. Métabolisme du NP dans les feuilles excisées de blé	81
3. Métabolisme du NP dans la racine de radis	82
<b>II. Absorption du nonylphénol par les plantes</b>	<b>82</b>
1. Essais sur les hydroponiques de radis	82
2. Cultures de blé en hydroponique	83
3. Cinétique d'absorption chez le blé	84
4. Influence du sol sur l'absorption du nonylphénol chez le blé	86
5. Cinétique d'adsorption chez le radis	87
6. Essais préliminaires sur sol amendé	88
<b>Conclusion de la partie expérimentale</b>	<b>91</b>
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b>	<b>94</b>
<b><u>CONCLUSION GENERALE</u></b>	<b>101</b>
<i>Bibliographie</i>	<i>107</i>
<i>Table des matières</i>	<i>119</i>
<i>Index des tableaux et figures</i>	<i>123</i>



## Index des Tableaux et figures

Figure 1.b : Les différents mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens	10
Figure 1 : Projet Européen pour l'établissement d'une liste de composés à évaluer	19
Figure 2 : Structures chimiques de l'oestradiol et de deux oestrogènes synthétiques	22
Figure 3 : Structure du tamoxifène	23
Figure 4 : Structure chimique de quelques phyto-oestrogènes et myco-oestrogènes	24
Figure 5 : Structures chimiques de trois pesticides organochlorés	25
Figure 6 : Voies de synthèse des PCDDs et des PCDFs	26
Figure 7 : Structure générale des PCDDs	26
Figure 8 : Structures chimiques d'un PCB et d'un PCB hydroxylé	26
Figure 9 Structures chimiques du BPA, résines époxy et polycarbonates	27
Figure 10 : Structures chimiques des principaux phtalates	27
Figure 11 : Structures chimiques des principaux AP et APE <i>para</i> -substitués.	28
Figure 12 : Activation du récepteur aux oestrogènes par liaison de son ligand	33
Figure 13 : Mécanisme d'action des PCBs	35
Figure 14 : Mécanisme d'action du TBT, phénomène d'imposex	36
Figure 15 : Activation du récepteur nucléaire Ah par la TCDD	36
Figure 16 : Test de liaison d'un ligand sur un récepteur	45
Figure 17 : Test d'activation du récepteur aux oestrogènes sur levures transfectées (YES)	48
Figure 18 : Structure chimique du NP et de quelques isomères	56
Figure 18b : Variation de l'activité oestrogénique de différents isomères du 4-NP	61
Figure 18c : Activités oestrogéniques relatives de différents isomères du 4-NP	61
Figure 19 : Biodégradation des nonylphénols polyéthoxylés dans les STEP	67
Figure 20 : Protocole de traitement des plantes	74
Figure 21 : Protocole d'utilisation des cartouches C <sub>18</sub>	75
Figure 22 : Gradient CHLP	75
Figure 24 : Schéma de mise en place des cultures hydroponiques	76
Figure 24 : Protocole de traitement des feuilles excisées	78
Figure 25 : Radio-CHLP du 4- <i>n</i> -NP dans des cellules de tabac	80
Figure 26 : Radio-CHLP du 4- <i>n</i> -NP dans des feuilles excisées de blé	81
Figure 27 et 28 : Résultats des essais menés sur des radis en condition hydroponiques	82
Figures 29, 30 : Cinétique d'absorption du 4-NP chez le blé	84



Figures 31, 32 : Evolution des concentrations de 4-NP chez le blé	85
Figure 33 : Influence des sols sur l'absorption du 4-NP chez le blé	86
Figures 34 et 35 : Cinétique d'absorption du 4-NP chez le radis	87
Figure 36 : Evolution des concentrations de NP dans les feuilles de radis	87
Tableau 1 : Exemples d'effets des perturbateurs endocriniens sur les humains et les animaux	16
Tableau 2 : effets attribués à l'exposition au DES	17
Tableau 3 : Exemples d'atteintes liées à l'exposition de travailleurs à des composés perturbateurs endocriniens	21
Tableau 4 : Exemples de composés à usage clinique et mécanismes de leur interaction avec le système endocrinien	23
Tableau 5 : Action des PCBs sur la thyroïde	30
Tableau 6 : Agents environnementaux responsables d'effets anti-thyroïdiens	31
Tableau 7 : Exemples d'atteinte des fonctions de reproduction humaines en relation avec l'exposition à des perturbateurs endocriniens	39
Tableau 8 : Activités oestrogéniques relatives de composés soumis à des tests <i>in vitro</i>	53
Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques du NP	56
Tableau 10 : LOEC et EC <sub>10</sub> du NP sur des invertébrés du sol	60
Tableau 11 : Contamination de l'environnement par le NP	65
Tableau 12 : Contamination des organismes aquatiques par les AP et les APE	66
Tableau 13 : Concentration du 4-NP dans des plants de blé cultivés en hydroponique	83
Tableau 14 : Accumulation du NP dans des plants de blé cultivés en terre	85
Tableau 15 : Absorption du NP dans de plantes cultivées sur sols amendés ou non par des boues de STEP	88





## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



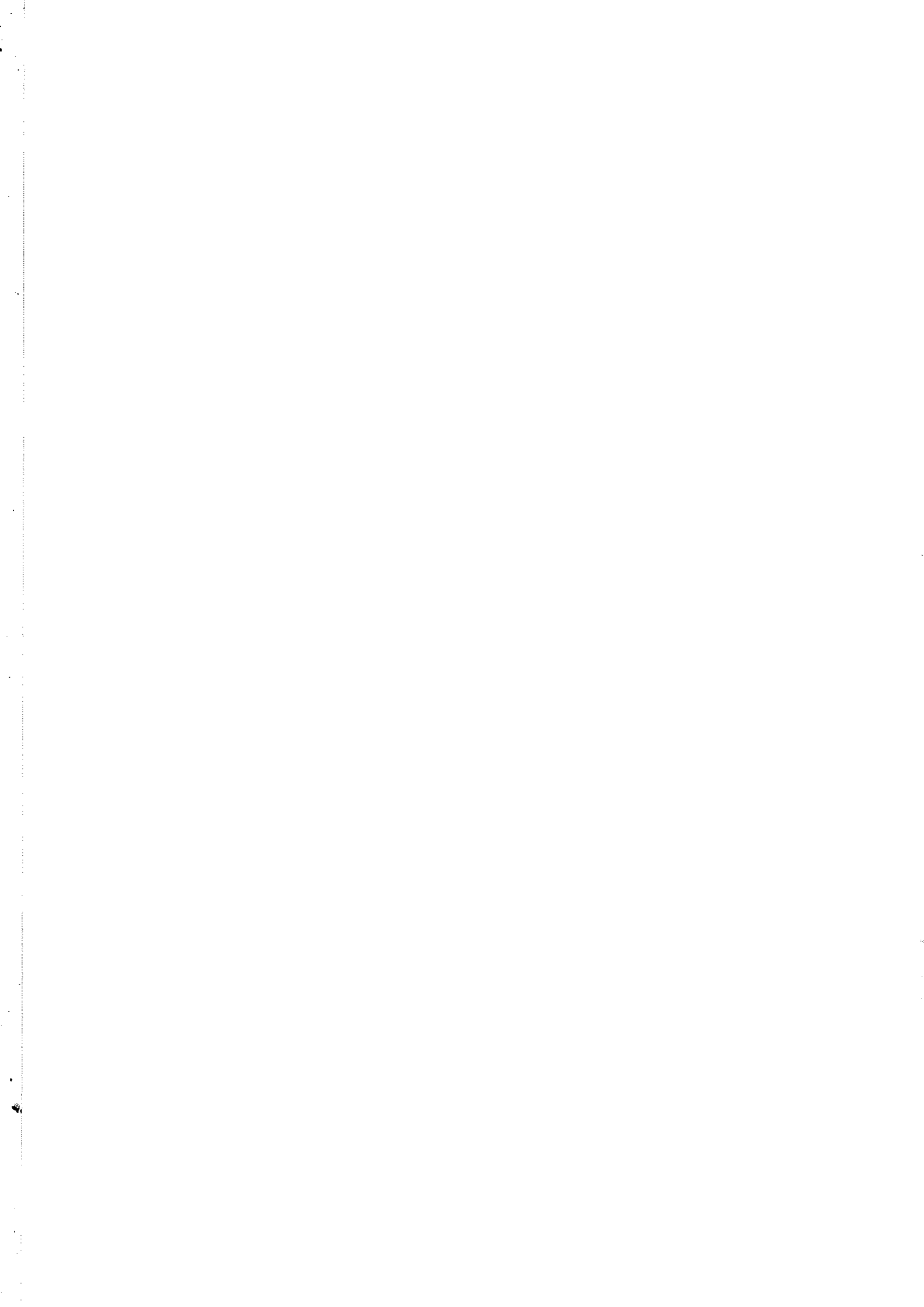
BON A IMPRIMER N° 325

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ



---

## RESUME

De nombreux composés chimiques synthétisés par l'homme et relargués dans l'environnement peuvent jouer un rôle de perturbateur endocrinien et provoquer des dysfonctionnements hormonaux. Plusieurs atteintes de la faune sauvage mais aussi de populations humaines ont ainsi été reliées à la présence dans l'environnement de tels contaminants. Parmi ces composés on retrouve des pesticides, des vernis, des retardateurs de flamme, des adjuvants pour matières plastiques ou encore des constituants de peintures pour bateaux. Le nonylphénol (NP) fait partie de ces contaminants, il est issu essentiellement de la biodégradation de détergents non ioniques dans les boues de station d'épuration (STEP). Les boues de STEP étant valorisées en agriculture, une fraction non négligeable de ce produit pourrait contaminer les sols. L'absorption du NP dans des plantes cultivées a été suivie à l'aide d'un traceur radioactif, le  $^{14}\text{C}$ -*n*-NP, afin de déterminer si les consommateurs peuvent être exposés à ce contaminant *via* la consommation de plantes cultivées. Les résultats obtenus suggèrent que l'absorption du NP est faible. La composante sol semble jouer un rôle important et il se pourrait que les produits absorbés soient des métabolites du NP résultant de sa dégradation par les bactéries du sol. Les boues pourraient avoir un impact sur l'absorption et le stockage du NP dans la plante mais ce point reste à confirmer.

---

**DISCIPLINE :** Pharmacie

---

**MOTS-CLES :** Perturbateurs endocriniens, Nonylphénol, Absorption, Traceur radioactif, boues de STEP.

---

Laboratoire des xénobiotiques (UMR 1089), INRA Toulouse  
183 chemin de tournefeuille  
31931 TOULOUSE