

# **Environnement et Reproduction**

**Françoise Paris, Charles Sultan**

**Patrick Balaguer**

**Béatrice Terouanne**

**Jean-Claude Nicolas**

**1 - Unité d'Endocrinologie et Gynécologie Pédiatriques, Service de  
Pédiatrie I, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU Montpellier, France**

**2 - INSERM U.540 et Service d'Hormonologie (Développement et Reproduction),  
Hôpital Lapeyronie, CHU Montpellier, France**

# **Environnement et Reproduction**

**1- Problématique des interrupteurs hormonaux**

**2- Développement de lignées cellulaires bioluminescentes**

**3- Utilisation des lignées cellulaires bioluminescentes**

**4- Conclusion**

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

### \* Constatations / règne animal

anomalies de la différenciation sexuelle

*(Guillette 1999, 2001)*

dans de nombreuses espèces animales

dans des zones / polluants environnementaux  
(DDT, DDE, PCB)

réaugmentation des grossesses chez des  
phoques de la mer Baltique

parallèlement à une ↓ des taux de de PCB et  
de DDT

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

### \* Constatations chez l'homme

Altération de la qualité du sperme

↑ de fréquence des cryptorchidies et des hypospadias

↑ d'incidence du cancer du testicule

Dans de nombreux  
pays

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

. Altération de la qualité du sperme

**Diminution du compte spermatique constatée dans de nombreux pays**

. Cryptorchidie néo-natale

N = 0.9 - 1.4% 1 - 13% (registres)

Oxford = 0.9% 1.61%

GB : le nombre d'orchidopexie x 2 en 17 ans

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

. Hypospadias néo-natal

GB = 7.3 / 10.000 NN 16 / 10.000 NN (> 15 ans)

USA (Atlanta) = 20.2 / 10.000 NN 39.7 / 10.000 NN (> 20 ans)

France (Rhône-Alpes) = 5.5 / 10.000 NN 13.1 / 10.000 NN (> 17 ans)

. Cancer du testicule

**Augmentation de la fréquence du cancer du testicule dans le monde**

Canada (Ontario) = 2.8 / 100.000 4.8 / 10.000 NN (1969-1991)

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

- Expérience Montpelliéraine en endocrinologie pédiatrique de 1998 à 2005:

micropénis isolés x 2

cryptorchidies isolées x 2

PHM x 2.5

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

- Etude de la prevalence des malformations génitales du nouveau-né masculin (analyse / cas témoin)

Janvier 2002 -Avril 2003 = 1615 nouveaux-nés masculins / 3148 naissances  
1442 nouveaux-nés masculins examinés (89%)

Malformations de OGE n = 39 (2,7%)

- cryptorchidie	n = 18	→	1.3%	vs N: 1.1%
- hypospadias	n = 16	→	1.1%	vs N: 1/1000
- micropénis	n = 5	→	0.35%	
- PHM	n = 2	→	0.14 %	vs N: 1/20.000

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

### Environnement professionnel des parents (pesticides)

- 39 malformations des OGE = 29% (envir. contaminé)

- 76 témoins = 14% (envir. contaminé)

$p = 0.08$

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

### \* Données expérimentales

rats exposés in utéro à différents polluants (ex: DDE)

⇒ anomalies de la différenciation sexuelle *Gray, 2001*

rats exposés en période néonatale à du PCB

⇒ altération de la spermatogénèse *Sager, 1991*

pouvoir estrogénique / antiandrogénique de nombreux polluants environnementaux

# Environnement et Reproduction

## 1- Problématique des interrupteurs hormonaux

Constatations / règne animal

Constatation chez l'homme  
(rapidité de développement)

Données expérimentales



Hypothèse de la responsabilité  
des contaminants  
environnementaux



Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes  
mieux appréhender le mécanisme d'action de ces polluants  
détection de ces polluants dans les milieux biologiques

# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

Lignées cellulaires stablement transfectées avec:

AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$

gène reporteur hormono-régulé



Evaluer l'activité des  
contaminants

Détecter la présence de  
contaminants  
environnementaux dans le  
sérum humain

# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

\* Cellules ER $\alpha$  et ER $\beta$



cellules hôtes: cellules HeLa, humaines, cancer du col utérin

plasmides transfectés: pSG5-Puro-hER $\alpha$  ou  $\beta$  → résistance à la puromycine

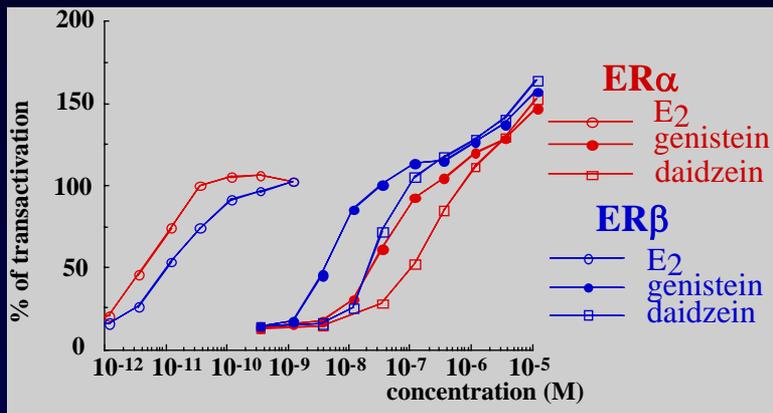
pERE- $\beta$ Glob-Luc-Néo → résistance à la néomycine

Balaguer P. et al., *Sci Total Environ*, 1999, 233: 47-56

# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

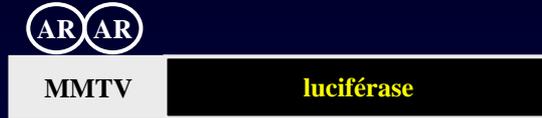
Réponse des cellules ER $\alpha$  et ER $\beta$  à l'estradiol ainsi qu'à différents contaminants



# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

\* Cellules PALM



cellules hôtes: cellules PC 3, humaines, cancer de prostate, AR  $\ominus$

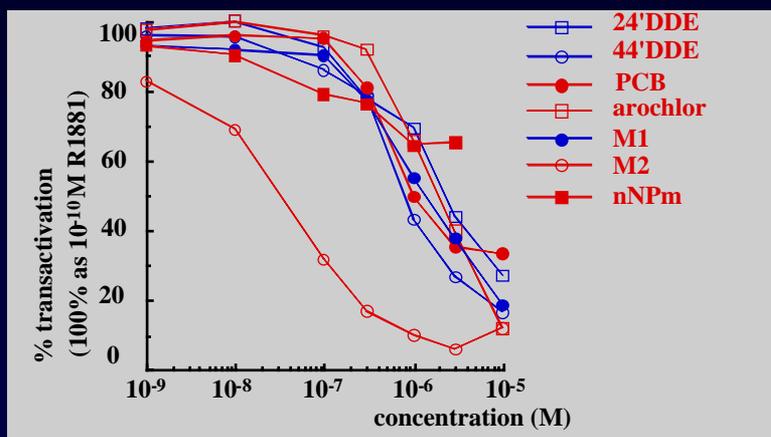
plasmides transfectés: pSG5-Puro-hAR  $\rightarrow$  résistance à la puromycine  
pMMTV-Néo-Luc  $\rightarrow$  résistance à la néomycine

*Terouanne B., Mol.Cell.Endo., 2000, 160: 39-44*

# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

Détection de l'activité antiandrogénique de certains composés avec les cellules PALM



# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

\* Cellules CHO 515



lignée stable CHO 515

Cellules hôtes →

cellules CHO, ovaire de hamster

Gènes transfectés

pSG<sub>5</sub>-puro-hAR

exprime une résistance à la puromycine

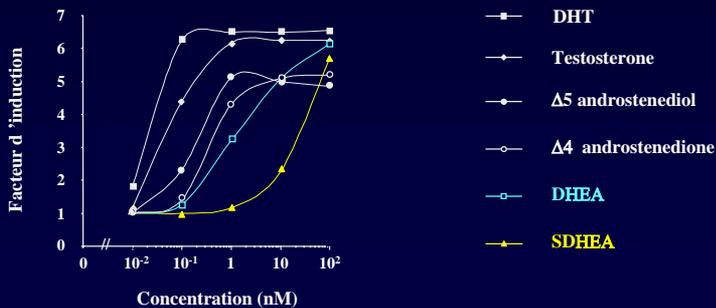
pMMTV-Neo-Luciférase

exprime une résistance à la néomycine

# Environnement et Reproduction

## 2- Développement de lignées cellulaires stables bioluminescentes

### Réponse des cellules CHO515 à différents androgènes



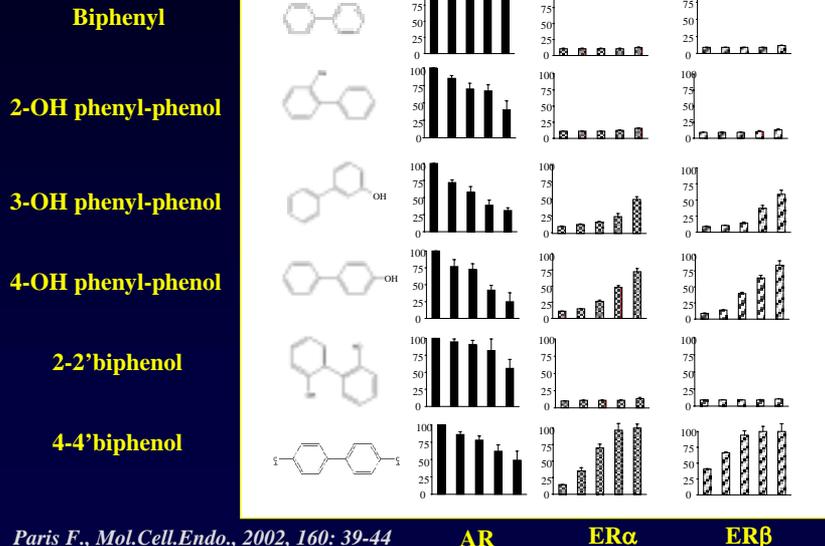
# Environnement et Reproduction

## 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

→ Typage de l'activité de différents contaminants environnementaux

exemple des phenylphenols et des bisphenols

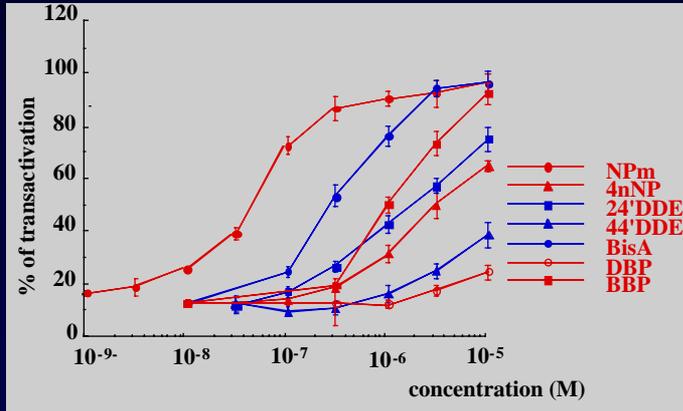
### Phenylphenols and biphenols exhibit $\alpha$ and $\beta$ estrogen and antiandrogen activities



# Environnement et Reproduction

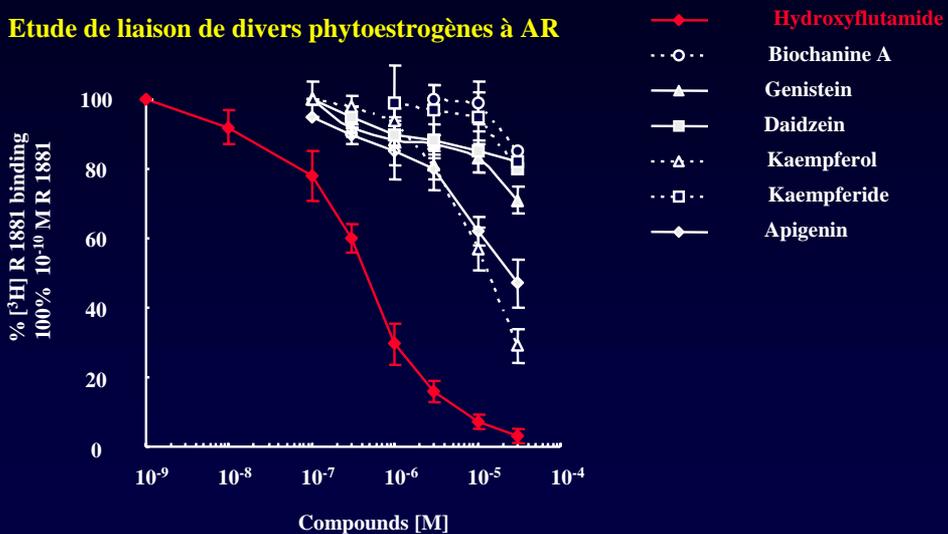
## 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

Activité estrogénique de divers PEE dans les cellules ER $\alpha$



# Environnement et Reproduction

Etude de liaison de divers phytoestrogènes à AR



## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

Trafficking de AR dans les cellules Cos-7  
en présence de Zearalanone

R 1881  $2.10^{-10}$  M



Zearalanone  $10^{-5}$  M



Zearalanone  $10^{-5}$  M  
+  
R 1881  $2.10^{-10}$  M



→ En 2 heures, la zearalanone ralentit le transfert de AR au noyau et prévient la formation de foci

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

Trafficking de AR dans les cellules Cos-7  
en présence de Génistéine

R 1881  $2.10^{-10}$  M



Genistéine  $3 \cdot 10^{-5}$  M



Genistéine  $3 \cdot 10^{-5}$  M +  
R 1881  $2.10^{-10}$  M



→ En 2 heures, la genistéine ralentit le transfert de AR au noyau et prévient la formation de foci

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

→ Détection in vivo / sérum humain

activité estrogénique du sérum

activité androgénique du sérum

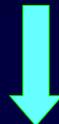
## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

#### Activité estrogénique du sérum

Pourquoi un nouveau dosage d'estradiol?

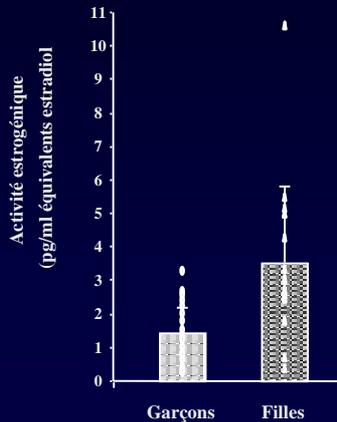
Méthodes immunologiques: Variabilité des résultats  
Fiabilité / taux élevés d'estradiol  
Dosage de l'estradiol seul



Nouveau dosage: Fiabilité y compris pour les taux faibles  
Evaluation d'une activité estrogénique globale

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes



#### Filles et garçons prépubères

Paris, Servant, Terouanne, Balaguer, Nicolas, Sultan  
*J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87 (2) pp.791-797

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

. Dosage de l'activité estradiol dans sa globalité

. Méthode de dosage sensible < 1 pg /ml

. Méthode de dosage rapide  
15 sérums / jour

. Utilisation de cellules humaines

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

#### Applications

##### . Physiologie

activité estrogénique de l'ovaire et du testicule      prépuberté  
phase de latence

##### . Clinique      →      évaluation de l'activité estrogénique

- chez l'enfant: des garçons ayant une gynécomastie prépubertaire
- chez l'adulte: endocrinologie  
gynécologie  
cancérologie  
dermatologie

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

#### Pseudohermaphroditismes masculins à révélation néonatale

PHM | à testostérone normale  
séquence du gène du R $\alpha$ A et de la 5 $\alpha$ R normale

3 patients:

notion de contamination in utéro par des polluants environnementaux

## Environnement et Reproduction

	P1	P2	P3
age (semaines)	2	4	28
micropenis (mm)	15	10	20
cryptorchidie	bilaterale	-	G
hypospadias	+	+	-
caryotype	46 XY	46 XY	46 XY
testosterone (ng/ml)	0,64	1,60	< 0,1
testosterone/HCG (ng/ml)	4,1	5,46	5,36
sequence gène AR	N	N	N
sequence gène 5αR	N	N	N

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

**P1:** famille vivant dans une région d 'agriculture intensive  
mère travaillant près d'une station d 'épuration des eaux

**P2:** famille vivant dans une région d 'agriculture intensive

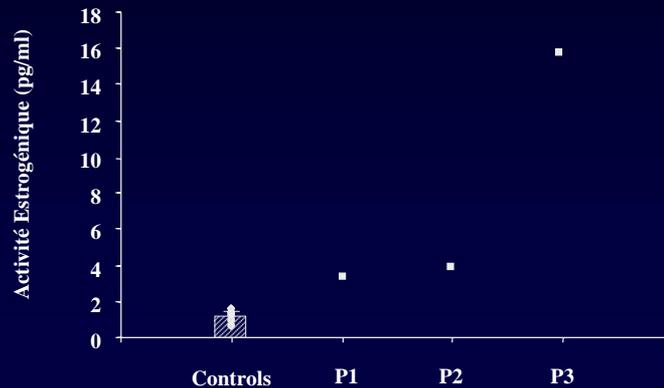
**P3:** parents agriculteurs

	P1	P2	P3	Contrôles (n=15)
Activité estrogénique (pg/ml)	3,3	3,8	16	1,1 +/- 0,4

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

Pseudohermaphroditismes masculins à révélation néonatale



## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

PHM idiopathique

Notion d'exposition à des contaminants environnementaux

Augmentation d'activité estrogénique / contrôles

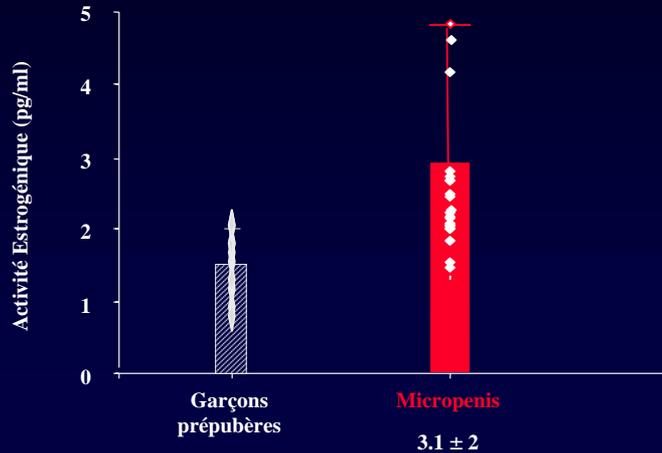


responsabilité des disrupteurs  
endocriniens dans ces 3 cas de PHM ?

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

Garçons prépubères avec un micropénis (n=17)



## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

Gynécomastie prépubertaire du garçon sans étiologie connue

garçons de 7 à 10 ans

n = 4

E2 < 9 pg/ml

T < 0,1 ng/ml

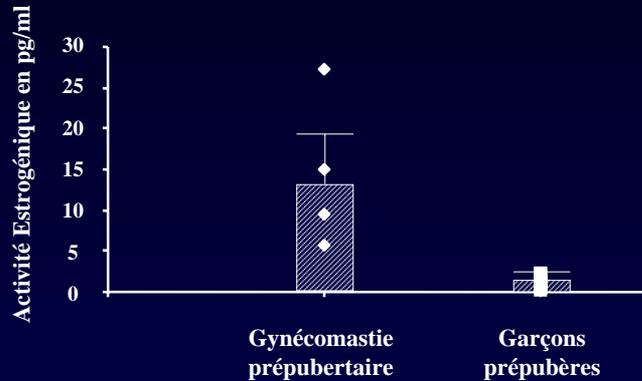
AE moy. = 14 +/- 8 pg/ml

vs

1,4 +/- 0,9 pg/ml

## Environnement et Reproduction

### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes



Contamination ?

Aromatisation excessive ?

## Environnement et Reproduction

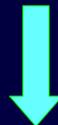
### 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes

#### Activité androgénique du sérum

Pourquoi développer un dosage de l'activité androgénique globale?

Méthodes immunologiques → évaluation isolée de différents androgènes  
(T, DHT, SDHEA,  $\Delta 4$ )

Ne reflètent pas l'activité androgénique globale (*Labrie et al.*)

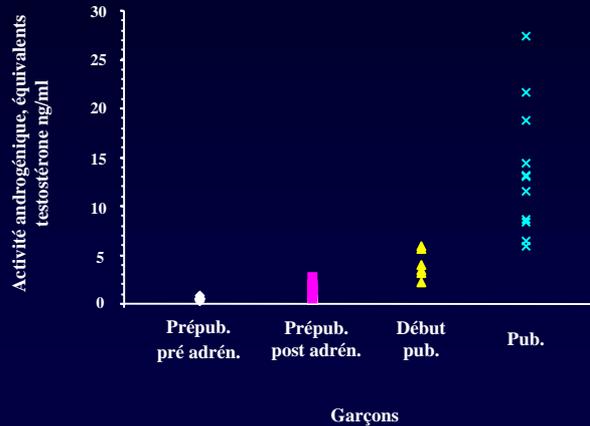


Nouveau dosage:

Evaluation d'une activité androgénique globale (CHO515)

# Environnement et Reproduction

## 3- Utilisation des lignées cellulaires stables bioluminescentes



# Environnement et Reproduction

## 4- Conclusions

Problématique des interrupteurs hormonaux :

enjeux majeurs

enfant  
adulte

Fertilité masculine



Nécessité de développer des méthodes:

d'études in vitro → activité

estrogénique  
anti-androgénique

détection in vivo