

Possibles effets endocriniens de l'herbicide Roundup (glyphosate) et de deux xénoestrogènes, la génistéine et le 4-tert-octylphénol

Période : septembre 2011 à décembre 2011

Pierre CRETZAZ

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

Mots clés : 4-tert-octylphénol, Apoptose, Capacitation des spermatozoïdes, Génistéine, Glyphosate, Perturbateurs endocriniens, Réaction acrosomique, Xénoestrogènes

Certains perturbateurs endocriniens sont soupçonnés de pouvoir induire chez l'homme des effets négatifs sur le développement et la fonction reproductrice mâle. Cette note explore cette hypothèse en analysant deux études *in vitro*. La première étude traite des effets possibles de l'herbicide Roundup et de sa substance active, le glyphosate, sur les cellules testiculaires de rat. La seconde étude *in vitro* étudie l'impact de deux xénoestrogènes, la génistéine et le 4-tert-octylphénol, sur la formation des spermatozoïdes chez la souris.

Un herbicide à base de glyphosate peut induire *in vitro* une nécrose et apoptose des cellules testiculaires du rat, ainsi qu'une diminution de la testostérone à de faibles niveaux d'exposition

Clair E, Mesnage R, Travert C, Séralini G. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol In Vitro*. 2012; 26: 269-279. Epub 2011 Dec 19.

Résumé

Le Roundup est l'un des herbicides les plus utilisés au monde. De nombreuses plantes ont été génétiquement modifiées ces dernières années afin de les rendre résistantes à sa substance active, le glyphosate, augmentant ainsi la consommation de cet herbicide. Le Roundup se compose de 360 g/l de glyphosate et de différents xénobiotiques⁽¹⁾ utilisés comme adjuvant (son principal adjuvant est le POEA = polyethoxylated tallowamine), représentant ainsi un bon cas de figure pour étudier les effets combinés de plusieurs xénobiotiques (Richard *et al.*, 2005). L'impact du Roundup sur le système reproductif est assez bien documenté (Dallegrave *et al.*, 2007), mais son possible effet sur les testicules a été jusqu'à ce jour peu étudié. Or, les testicules sont connues pour être des glandes sensibles aux perturbateurs endocriniens (Anway *et al.*, 2006). La présente étude de Clair *et al.*, (2011) vise à étudier les effets du Roundup et du glyphosate sur les principales cellules testiculaires adultes du rat, à savoir les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales. La cytotoxicité, la nécrose⁽²⁾, l'apoptose⁽³⁾ et la perturbation endocrinienne ont été testées sur ces différents types de cellules testiculaires.

Il est apparu que les cellules de Leydig sont celles qui sont le plus fortement sensibles au Roundup en comparaison à une exposition unique au glyphosate. Après 6 heures de traitement, le Roundup

et le glyphosate peuvent induire une apoptose des cellules de Leydig. Un effet cytotoxique du Roundup *via* la dégradation de la membrane cellulaire a pu être mis en évidence dans les cellules de Leydig à des doses 1000 fois inférieures à celles des produits commerciaux à base de glyphosate. Ces doses correspondent à des niveaux 10 fois inférieurs à la plus faible dilution utilisée en agriculture comme pesticide. Le Roundup s'attaque à la membrane cellulaire, alors que le glyphosate ne le fait pas, sans doute du fait des adjuvants présents dans cet herbicide. Il a été testé si la cytotoxicité du Roundup *via* la dégradation de la membrane cellulaire était due à la nécrose ou à l'apoptose. La nécrose est alors apparue comme la principale cause de mortalité cellulaire. La perturbation endocrinienne a été étudiée *via* les niveaux d'ARNm pour les récepteurs d'aromatase, d'androgène et d'estrogène. Une baisse du niveau de testostérone, induite par le Roundup et le glyphosate, a été le seul effet endocrinien qui a pu être rapporté à des faibles concentrations de Roundup.

Dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales, le Roundup induit une chute de caspases⁽⁴⁾ 3/7, ce qui témoigne d'une nécrose avec une dégradation de la membrane cellulaire; cette dégradation est moins importante que celle observée dans les cellules de Leydig. Les cellules de Sertoli étudiées de manière isolée sont apparues comme sensibles, alors que ces cellules ne le sont presque pas en présence de cellules germinales.

Commentaire

Cette étude est une des premières études à tester les effets du Roundup et de sa substance active, le glyphosate, sur des cellules testiculaires. Elle propose un modèle *in vitro* permettant d'étudier les effets des xénobiotiques sur ces cellules reproductrices. Les effets différents du Roundup sur les différentes cellules testiculaires pourraient s'expliquer par la différence de leurs

membranes cellulaires. Il ressort de cette étude que le Roundup pourrait agir comme un perturbateur endocrinien, car il perturbe le niveau de testostérone dans les cellules testiculaires à des doses de 1-10 ppm. Une des originalités de cette étude est d'étudier simultanément divers composés (glyphosate et Roundup) afin de pouvoir évaluer les effets combinés de plusieurs xénobiotiques. La sensibilité générale des cellules testiculaires au Roundup, que ce soit par perturbation des caspases 3/7 ou par la dégradation de la membrane cellulaire, peut s'expliquer par une sensibilité combinée au glyphosate et aux adjuvants du Roundup ou par une sensibilité majeure à un des adjuvants. L'impact possible des adjuvants sur la toxicité totale d'un produit apparaît dans cet article; cela suggère que des effets peuvent ne pas être détectés en testant la toxicité chronique uniquement sur la substance active (ici le glyphosate) et non pas sur le produit (ici le Roundup). L'effet cytotoxique rapporté à des niveaux 10 fois inférieurs au plus faible niveau de dilution utilisé en agriculture pourrait être considéré lors de futures évaluations du risque de ce type d'herbicide. Des travaux précédents ont indiqué que certains effets du Roundup sont liés au POEA. Cet adjuvant pourrait donc être testé avec le modèle *in vitro* proposé dans cette étude afin d'évaluer ses effets et de mettre en évidence un éventuel impact combiné avec le glyphosate ou avec le glyphosate et les autres adjuvants du Roundup. La pertinence du modèle *in vitro* utilisé pour évaluer les effets sur le développement et la fonction reproductrice mâle mériterait un examen approfondi dépassant le cadre de cette note.

Des substances xénoestrogènes peuvent altérer le comportement des spermatozoïdes chez la souris

Park Y, Mohamed E, Kwon W, You Y, Ryu B, Pang M. Xenoestrogenic chemicals effectively alter sperm functional behavior in mice. *Repro Tox.* 2011; 32: 418-424.

Résumé

La génistéine est un phyoestrogène pouvant interagir avec les récepteurs d'estrogène et ainsi induire une réponse biologique (Kuiper *et al.*, 1997). L'exposition humaine à cette isoflavone a lieu principalement *via* la consommation de produits du soja. Il a été montré que la génistéine peut induire chez le rat des effets dans divers tissus sensibles aux estrogènes, et ceci à des doses comparables au niveau d'exposition de l'homme. Quelques études suggèrent aussi que la génistéine peut avoir un impact sur les spermatozoïdes (Delclos *et al.*, 2001). Le 4-tert-octylphénol est pour sa part une substance industrielle présente à des niveaux d'exposition significatifs dans l'environnement. Il peut se fixer sur les récepteurs d'estrogène. Son effet sur les spermatozoïdes a été très peu évalué à ce jour (Mohamed *et al.*, 2011). La présente étude de Park *et al.* (2011) étudie les effets estrogènes de la génistéine et du 4-tert-octylphénol, en caractérisant leurs impacts sur la capacitation⁽⁵⁾ et la réaction acrosomique⁽⁶⁾ des spermatozoïdes. Les résultats obtenus pour ces xénoestrogènes⁽⁷⁾ sont alors comparés à ceux de deux hormones endogènes (l'estrogène et la progestérone) et de l'héparine. L'héparine,

une molécule utilisée en médecine comme anticoagulant, a été retenue comme contrôle positif car elle est connue pour induire la capacitation et la réaction acrosomique. Les spermatozoïdes ont été prélevés sur des souris âgées de 9 semaines. Ils ont ensuite été incubés pendant 15 ou 30 minutes à six concentrations différentes (allant de 0,001 à 100 µM) des deux xénoestrogènes retenus. Le test CTC (chlorotétracycline) a été entrepris pour mesurer la capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes. Aucun effet sur la capacitation n'a été observé après une exposition pendant 15 minutes à des concentrations de 0,001 à 1 µM de génistéine. Mais les concentrations de 10 et 100 µM ont conduit à une diminution significative de la capacitation des spermatozoïdes. Aucun effet n'a été rapporté sur la réaction acrosomique après une exposition de 15 minutes. Avec une durée d'exposition de 30 minutes, la capacitation a été affectée à la concentration de 10 µM, et ceci à un niveau comparable à celui rapporté avec le contrôle positif. La réaction acrosomique a alors été stimulée à des concentrations allant de 0,1 à 100 µM. Concernant le 4-tert-octylphénol, la capacitation des spermatozoïdes a augmenté significativement à des concentrations allant de 0,01 à 0,1 µM après une exposition de 15 minutes; la réaction acrosomique a alors été stimulée significativement à hautes concentrations (10 et 100 µM). Après 30 minutes d'exposition, la capacitation des spermatozoïdes a augmenté significativement à toutes les concentrations testées, mais aucun effet n'a été rapporté sur la réaction acrosomique.

Commentaire

Les spermatozoïdes sont un modèle intéressant pour étudier l'activité estrogène des perturbateurs endocriniens, car leur membrane présente des récepteurs hormonaux sur lesquels peuvent se fixer ces substances. Malgré cela, la majorité des études entreprises à ce jour sur la génistéine et le 4-tert-octylphénol n'ont pas étudié en détail les spermatozoïdes. La présente étude permet de combler partiellement cette lacune. Le résultat principal pour la génistéine est qu'une exposition pendant 30 minutes à cette isoflavone entraîne une stimulation significative de la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris, et ceci d'autant plus fortement que la concentration d'exposition est élevée. À la plus haute concentration testée (100 µM), la génistéine augmente même la proportion de spermatozoïdes avec une réaction acrosomique de façon plus significative que l'estrogène et l'héparine. L'effet principal du 4-tert-octylphénol est une augmentation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes à la plus haute dose testée après une exposition de 15 minutes, alors qu'une exposition pendant 30 minutes induit une augmentation de la capacitation. Cela suggère que l'effet sur la capacitation dépend de la durée d'exposition. Ce facteur « durée d'exposition » est important dans la perspective d'extrapoler les résultats de cette étude à l'homme, et devrait être étudié plus en détail dans le futur afin de tenir compte de l'exposition à long terme de l'homme. Des études complémentaires sont requises pour confirmer que la génistéine et le 4-tert-octylphénol peuvent induire chez l'homme des effets sur les spermatozoïdes *via* une altération de la capacitation et de

la réaction acrosomique. Un autre modèle que la souris pourrait être utilisé dans une étude future, car les estrogènes se fixent chez l'homme aux récepteurs ER α et ER β qui sont absents des spermatozoïdes de la souris. Finalement, le modèle *in vitro* proposé devrait encore être testé sur d'autres xénoestrogènes afin d'évaluer s'il représente un modèle fiable et pertinent pour mettre en évidence les effets physiologiques des composés xénoestrogéniques sur les fonctions spermatiques. Les effets observés à ce stade pour la génistéine et le 4-tert-octylphénol n'apparaissent que secondaires, et doivent être interprétés au regard des résultats obtenus dans les mêmes conditions pour des stéroïdes connus.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Deux études *in vitro* étudiant les effets sanitaires possibles des perturbateurs endocriniens ont été présentées dans cette note. La première étude a porté sur les effets possibles de l'herbicide Roundup et de sa substance active, le glyphosate, sur les cellules testiculaires du rat. Elle a fait apparaître que les effets différents du Roundup sur les différentes cellules testiculaires pourraient s'expliquer par la différence de leurs membranes cellulaires. Il ressort de cette étude que le Roundup pourrait agir comme un perturbateur endocrinien en perturbant le niveau de testostérone dans les cellules testiculaires. Il faut souligner l'importance de la co-exposition au glyphosate et aux adjuvants, et donc des synergies possible avec le produit Roundup. Dans cette perspective, l'adjuvant POEA pourrait être testé avec le modèle *in vitro* proposé afin d'évaluer ses effets et de mettre en évidence un éventuel impact combiné avec le glyphosate et/ou avec les autres adjuvants du Roundup. La seconde étude *in vitro* a étudié chez la souris l'impact de deux substances xénoestrogènes, la génistéine et le 4-tert-octylphénol, sur les modifications physiologiques que doivent subir les spermatozoïdes avant de pouvoir pénétrer la membrane cellulaire de l'ovule. Cette étude a fait apparaître que l'exposition pendant 30 minutes à la génistéine peut entraîner une stimulation significative de la réaction acrosomique des spermatozoïdes, alors que l'effet principal du 4-tert-octylphénol est une augmentation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes à la plus haute dose testée après une exposition pendant 15 minutes. Le facteur « durée d'exposition » devrait être étudié plus en détail dans le futur afin de tenir compte de l'exposition à long terme de l'homme. Les conclusions de ces deux études nécessitent d'être vérifiées dans d'autres études et sur d'autres modèles avant de pouvoir conclure. Un grand travail reste donc à accomplir dans les années à venir pour mieux évaluer les risques liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens, en particulier à de faibles doses d'exposition.

Lexique

- (1) Xénobiotiques : les xénobiotiques sont des substances chimiques pouvant être toxiques pour l'organisme humain, y compris à de faibles concentrations d'exposition.
- (2) Nécrose : la nécrose des cellules est leur mort causée par des enzymes spéciales. La cassure de la membrane plasmique qui en résulte conduit à la libération dans le milieu extérieur du contenu cytoplasmique. Contrairement à l'apoptose, la nécrose est habituellement accompagnée d'une réponse inflammatoire.
- (3) Apoptose : l'apoptose ou mort programmée des cellules est le processus par lequel les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Cette mort cellulaire est physiologique, génétiquement programmée et absolument nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation.
- (4) Caspases : les caspases sont un groupe de protéases à cystéine. Elles jouent un rôle central dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation.
- (5) Capacitation : les spermatozoïdes doivent subir quelques modifications physiologiques avant de pouvoir pénétrer la membrane cellulaire de l'ovule. La capacitation est la première de ces modifications. Elle est accomplie par les spermatozoïdes durant l'ascension du tractus génital. Il s'agit d'un processus de maturation physiologique de la membrane des spermatozoïdes, condition préalable à l'étape suivante, la réaction acrosomique.
- (6) Réaction acrosomique : la réaction acrosomique est une réaction caractérisée par la fusion des enveloppes externes de la tête du spermatozoïde (membrane plasmique et membrane acrosomique externe). Cette fusion aboutit à la fenestration puis à la disparition de ces membranes, libérant le contenu de l'acrosome et permettant la mise en contact direct de la membrane acrosomique interne avec la zone pellucide (structure entourant l'ovocyte). Le spermatozoïde doit donc modifier la structure de sa tête *via* la réaction acrosomique afin de pouvoir traverser la zone pellucide.
- (7) Xénoestrogènes : les xénoestrogènes sont des substances chimiques étrangère à l'organisme humain et pouvant perturber la fonction hormonale de l'homme en agissant comme des estrogènes.

Publications de référence

- Anway M, Memon M, Uzumcu M *et al.* Transgenerational effect of the endocrine disruptor vinclozolin on male spermatogenesis. *J Androl.* 2006 ; 27 : 868–879.
- Dallegrave E, Mantese F, Oliveira R *et al.* Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol.* 2007 ; 81 : 665–673.

Delclos K, Bucci T, Lomax L et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol.* 2001; 15: 647-663.

Kuiper G, Carlsson B, Grandien K et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endoc.* 1997; 138: 863-870.

Mohamed E, Park Y, Song W et al. Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm. *Theriogenology.* 2011; 75: 1161-1169.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H et al. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 716-720.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Acrosome reaction, Endocrine disruptor, Spermatozoon, Testicular cells, Testosterone.

Revue de la littérature

Fowler P, Bellingham M, Sinclair K et al. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Mol Cell Endocrinol.* 2011. Sous presse.

Schug T, Janesick A, Blumberg B et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 127: 204-215.

Autres publications identifiées

Gore A, Walker D, Zama A et al. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Mol Endocrinol.* 2011; 25: 2157-2168.

Cette étude s'intéresse à l'exposition lors de la phase gestationnelle au méthoxychlor, et à la perturbation endocrinienne qui peut en découler sur le système reproductif féminin à l'âge adulte. Pour ce faire, un modèle in vivo a été retenu et l'expression de certains gènes a été caractérisée. Il apparaît que l'exposition in utero peut avoir des effets à long terme sur l'expression des gènes.

Dickerson E, Sathyapalan T, Knight R et al. Endocrine disruptor & nutritional effects of heavy metals in ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28: 1223-1228.

Cet article traite des effets endocriniens de métaux lourds comme le mercure, le zinc et le sélénium. Le niveau d'exposition à ces métaux a été mesuré dans les cheveux de 30 femmes. Les résultats obtenus suggèrent que le mercure a un effet néfaste sur la réponse ovarienne à la thérapie de fertilisation in vitro.

Carbone S, Samaniego YA, Cutrera R et al. Different effects by sex on hypothalamic-pituitary axis of prepubertal offspring rats produced by *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Neurotoxicology.* 2011; 33: 78-84.

Cette étude examine l'effet sur les paramètres neuroendocriniens d'une exposition pré et périnatale au DEHP chez le rat. Elle fournit de nouvelles données sur les changements produits par le DEHP sur les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation neuroendocrinienne.