



HAL
open science

Impact des facteurs environnementaux sur la fertilité : rôles du tabac et des pesticides

Rosalie Cabry-Goubet

► **To cite this version:**

Rosalie Cabry-Goubet. Impact des facteurs environnementaux sur la fertilité : rôles du tabac et des pesticides. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0060 . tel-03691927

HAL Id: tel-03691927

<https://theses.hal.science/tel-03691927>

Submitted on 9 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Physiologie Humaine*

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

De l'Université de Picardie Jules Verne

par

Rosalie Cabry-Goubet

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Impact des Facteurs Environnementaux sur la Fertilité :
Rôles du tabac et des pesticides***

**Soutenue le Mercredi 19 Décembre
Après avis des rapporteurs, devant le Jury d'Examen :**

Madame Le Professeur Rachel Levy	Rapporteur
Monsieur Le Professeur Anis Feki	Rapporteur
Monsieur Le Professeur René Frydman	Examineur
Madame Le Professeur Rachel Desaillood	Examineur
Madame Le Professeur Véronique Bach	Examineur
Monsieur Le Professeur Jean Bouquet de la Jolinière	Examineur
Monsieur Le Professeur Moncef Benkhalifa	Co- Directeur de Thèse
Madame Le Docteur Aviva Devaux	Co- Directrice de Thèse

A mon Maître,

*Monsieur le Professeur René FRYDMAN,
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier*

Vous me faites l'Honneur d'avoir accepté, 10 ans après ma Thèse de Médecine, de Présider de nouveau le Jury de cette Thèse de Doctorat,

Votre passion reste pour moi un exemple,

Je vous remercie pour l'intérêt et les mots d'encouragements que vous avez toujours eu en mon égard, ainsi que pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre équipe.

A mon Maître,

*Madame le Professeur Rachel LEVY
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier*

*Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être Rapporteur de mon
travail de Thèse de Doctorat,*

Soyez assurée de ma Reconnaissance et de mon profond Respect,

A mon Maître,

Monsieur le Professeur Anis FEKI
Professeur MD, PhD

*Vous me faites l'Honneur d'être Rapporteur de mon travail
de Thèse de Doctorat,*

*Veillez trouver ici l'expression de ma sincère Reconnaissance
pour m'avoir fait confiance et m'avoir accepté dans votre service dans
le cadre de mon année de mobilité*

Celle-ci fut riche de découvertes et d'enseignements

A mon Maître,

*Madame le Professeur Rachel DESAILLOU
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier*

*Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de Thèse de
Doctorat,*

*Travailler à vos côtés est un réel plaisir
Je suis certaine que nous avons encore un joli chemin commun à tracer*

A mon Maître,

Monsieur le Professeur Jean BOUQUET DE LA JOLINIÈRE
Professeur MD, PhD

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury,

Nous avons partagé tant de grandes discussions
Je vous remercie pour votre accueil et votre écoute au cours de mon
année dans les montagnes Fribourgeoises

A mon Maître,

*Madame le Professeur Véronique BACH
Professeur des Universités*

*Vous avez toujours été à mes côtés pour m'encourager malgré les
difficultés que j'ai pu rencontrées pour finaliser ce travail*

*Je vous remercie pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre
Unité de Recherche*

A mon Maître,

*Monsieur le Professeur Moncef BENKHALIFA
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier*

*Votre soutien indéfectible m'est très cher, je vous remercie de la
confiance que vous me témoignez*

A mon Maître,

*Madame le Docteur Aviva DEVAUX
Maître de Conférences Universitaires-Praticien Hospitalier*

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail,

*Je vous suis très reconnaissante de votre grande disponibilité, de la
patience et de la persévérance que vous avez témoignées au cours de ces
années partagées,*

*Malgré les difficultés rencontrées, vous pouvez être fière de ce
travail, qui est aussi le vôtre*

*A mon Maître, Monsieur le Professeur Henri COPIN,
Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir transmis votre passion pour
l'Histologie et son enseignement,
Veuillez trouver ici mon engagement pour les futures responsabilités que vous me
confierez au sein de votre service,*

*A mon Maître, Monsieur le Professeur Jean GONDRY,
Je vous remercie pour les responsabilités que vous me confiez,
J'espère être à la hauteur de celles qui seront à venir,*

*A mon Maître, Monsieur le Professeur Philippe MERVIEL,
Je vous remercie de m'avoir fait partager votre passion pour l'AMP,
De m'avoir toujours fait confiance et pousser à avancer, Envers et contre tout...*

*A Madame Le Docteur Anne-Sophie Hurtel,
Merci d'avoir répondu présente quand la situation paraissait insoluble,
Merci pour ta collaboration et ton engagement dans ce travail,*

*A Monsieur Le Docteur Mehdi Benchaïb,
Merci d'avoir, avec entrain et brio, accepté de réaliser les statistiques de ce travail, je
ne doute pas que nous partagerons d'autres travaux à venir...*

*A Florence Scheffler,
Pour tous les moments partagés, notre coopération m'est si chère et précieuse,*

*A Naïma Belhadri, Emmanuelle Lourdel, Héloïse Leconte, Camille Houette, Mélyne
Lombart, Marion Luisin, Clémence Lefranc, Elodie Lefranc et Paul-Antoine
Debailleul
Pour la joyeuse équipe que nous formons,*

*A Marlène Gallet, Noémie Celton, Guillaume Jedraszak et Yann Ferret,
Pour nos sympathiques échanges chromosomiques*

A toutes les internes de Gynécologie Médicale dont j'ai croisé le chemin,

*A Elodie Leclercq,
Ce PHRC, c'est un peu aussi ton bébé, merci pour ta bonne humeur et pour l'entrain
que tu as toujours su donner pour que ce projet puisse avancer*

*A Séverine Capelle, Ingrid Kanclerz, Amandine Achille et David Cannau
Pour votre participation à toutes les étapes de ce travail et la confiance que vous me
témoignez chaque jour,*

*A Marie-Pascale Laurence, Laure Leconte, Audrey Wilmort et Dany Patou,
Pour la joie de travailler tous les jours à vos côtés*

*A Frédéric Barbier et Isabelle Maerten,
Pour notre amitié,*

*A toute l'équipe des Techniciens de Cytogénétique,
Pour vos encouragements et votre soutien*

*A Sophie Bury,
Pour notre efficace et très appréciable collaboration,*

*A Fabienne Lobelle, Catherine Cazier, Caroline Geoffraoy, Florence Leroy et Nathalie
Picard,
Pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée,*

*A Aurélie Corona,
Pour les joyeuses heures de TP partagées,*

*A Corinne Cléré, Agnès Piel, Béatrice Peucelle, Anne-Marie Dubois,
Francoise Brasseur, Aline Receveur, Cécile Denaveau, Pauline Demailly,
Pour avoir été sur mon chemin,*

*A mes Parents et à mes Sœurs,
Que votre route soit belle et pleine de joies,*

A mes Joyeux Neveux, Nièces, Filleuls et Filleules,

*A Frédéric et à Ernest,
Pour votre soutien et votre Amour de tous les jours,*

*Heureux qui comme Ernest a fait un beau Voyage
Et qui, comme lui, a découvert de nouveaux Paysages.
Entre Lacs et Montagnes,
De la Neige en Hiver et des Marmottes en Eté,
Il gardera un Souvenir Chocolaté.*

SOMMAIRE

- Remerciements	Page 2
- Sommaire	Page 12
- Publications et Communications en rapport avec le sujet de la thèse	Page 17
1. Publications dans des revues indexées	17
2. Articles soumis	17
3. Communications orales réalisées à l'étranger	17
4. Communications orales nationales	18
5. Communications orales « Grand public »	18
6. Posters	19
- Titres	Page 21
1. Cursus hospitalo-universitaire	21
2. Formations et diplomes obtenus	22
3. Activités hospitalières	23
4. Activités universitaires	23
5. Activités de recherche	24
6. Participation aux sociétés savantes	25
7. Organisation de congrès et de journées d'étude	26
- Autres publications et communications réalisées	Page 27
1. Publications dans des revues indexées	27
2. Communications orales	30
- Liste des abréviations	Page 33
- Liste des illustrations	Page 36
1. Liste des tableaux	36
2. Liste des figures	40
- Résumé	Page 42
- Abstract	Page 43

Première Partie: Contextualisation de la Problématique..... Page 44

I.	<u>Définition des Perturbateurs Endocriniens (PE)</u>	Page 45
1.	Définition des hormones, du système endocrinien et des PE	45
2.	Mécanismes d'action des PE	45
3.	Classification des PE	46
4.	Voies, Types et Modes d'exposition aux PE	49
5.	Notions de toxicologie	51
6.	PE et Santé humaine	52
II.	<u>Impact des Perturbateurs Endocriniens sur la Fertilité</u>	Page 53
1.	Prise de conscience de l'impact des PE sur la fertilité	53
2.	Définition des Xéno-Hormones : Xéno-Estrogènes et Xéno-Androgènes	54
3.	Périodes d'exposition critiques aux Xéno-hormones	55
4.	Xéno-Hormones, Effet transgénérationnel et Empreinte épigénétique	56
5.	Impact des Xéno-Hormones sur la fertilité masculine	56
6.	Impact des Xéno-Hormones sur la fertilité féminine	58
III.	<u>Le tabac, un PE qui aurait un rôle sur la Fertilité ?</u>	Page 58
1.	Intoxication tabagique et Délai Nécessaire pour Concevoir (DNC)	59
2.	Impact du tabagisme féminin sur la fertilité	60
3.	Impact du tabagisme masculin sur la fertilité	66
4.	Impact du tabagisme parental sur la descendance	68
5.	Impact du tabagisme passif sur la fertilité et l'évolution des grossesses	71
IV.	<u>Les pesticides, des PE qui auraient un rôle sur la Fertilité ?</u>	Page 72
1.	Résultats de l'expérimentation animale	75
2.	Exposition aux pesticides, DNC et évolution des grossesses	76
3.	Pesticides et Fertilité féminine	78
4.	Pesticides et Fertilité masculine	79
V.	<u>Prise de conscience de la collectivité, Mesures et Réglementations</u>	Page 81

Deuxième Partie: Présentation des travaux réalisés et des résultats obtenus..... Page 83

1. Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives » **87**
2. Présentation de l'article intitulé « Impact of oocytes with CLG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure », **92**
3. Présentation de l'article intitulé « Qualité ovocytaire en FIV et exposition aux pesticides », **104**
4. Présentation de l'article intitulé « Endocrine disruptors and a potential decline in fertility : a case-control study in the Picardy region of northern France », **114**
5. Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « Résultats des analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes prises en charge en FIV+/- ICSI en fonction de leur statut tabagique », **135**
6. Présentation de la Méthodologie établie dans le cadre du PHRC « TABAFERTIMASC » **146**
7. Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse des questionnaires d'exposition toxique du PHRC « TABAFERTIMASC » **157**
8. Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse des données du PHRC **168**
9. Réalisation d'une plaquette d'informations à destination des couples en âge de procréer sur la thématique **184**
10. Présentation de l'article intitulé « Impact of prenatal and postnatal exposure to Chlorpyrifos (CPF) on the Wistar rat's offspring », **187**

Troisième Partie: Discussion et Perspectives de Recherche..... Page 208

I.	<u>Thématique: Impact du tabagisme sur la fertilité</u>	Page 209
1.	Le tabac, un facteur de risqué d'infertilité	209
2.	Le tabac, en cause dans la baisse de la reserve ovarienne	209
3.	Tabagisme et paramètres des tentatives d'AMP	210
4.	Les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires comme marqueurs de l'intoxication tabagique	211
5.	Passage de la barrière hémato-testiculaire des dérivés du tabac et impact sur la gamétogenèse	213
II.	<u>Thématique: Impact des pesticides sur la fertilité</u>	Page 216

Conclusion..... Page 217

Bibliographie..... Page 218

Annexes..... Page 228

TITRES ET TRAVAUX

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN RAPPORT

AVEC LE SUJET DE LA THESE

1. PUBLICATIONS DANS DES REVUES INDEXEES

- « *Impact of oocytes with CLCG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure* »

Merviel P, **Cabry-Goubet R**, Chardon K, Haraux E, Scheffler F, Mansouri N, Devaux A, Chahine H, Copin H, Benkhalifa M.

J Ovarian Research, 2017; 10 (1); 42. (IF = 2.367)

- « *Qualité ovocytaire en FIV et exposition aux pesticides* »

Merviel P, **Cabry-Goubet R**, Chardon K, Lourdel E, Scheffler F, Mansouri N, Devaux A, Bach V, Copin H, Benkhalifa M.

Article accepté dans « **Médecine de la Reproduction** », en cours de corrections en 10/2018.

2. ARTICLES SOUMIS

- « *Endocrine disruptors and a potential decline in fertility : a case-control study in the Picardy region of northern France* »

Cabry-Goubet R, Scheffler F, Noel J, Lombart M, Lourdel E, Belhadri N, Devaux A, Desaillood R, Copin H, Benkhalifa M.

Soumis à « **Journal Environmental Health and Preventive Médecine** » en 09/2018

(IF = 1.376)

3. COMMUNICATIONS ORALES REALISEES A L'ETRANGER

- « *Impact des perturbateurs endocriniens sur la fertilité : Etude cas-témoins* »

Communication orale aux **Journées du Groupement Romand de la Société Suisse de Gynécologie et Obstétrique (SRSSGO)**, 16 novembre 2017, Montreux, Suisse.

Communication orale récompensée du **Prix de la meilleure communication libre des journées du SRSSGO 2017**

4. COMMUNICATIONS ORALES NATIONALES

- **« *Impact du tabagisme sur les paramètres ovocytaires et embryonnaires après FIV/ICSI* »**
Journée Amiénoise de la Recherche en Santé (JARS),
Amiens, le 15 octobre 2015

- **« *Corrélation dans les liquides folliculaires des dosages hormonaux (FSH, LH, estradiol, testostérone) aux taux de nicotine et de cotinine.* »**
Journée des Jeunes Chercheurs, SFR CAP Santé,
Reims, le 20 Mars 2015

- **« *Ovocytes à cytoplasmes granuleux, impact sur les paramètres de l'AMP et le devenir des grossesses* »**
Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens (CHEC),
Amiens, le 21 mars 2014

- **« *Dosages des dérivés du tabac dans les liquides folliculaires et au niveau des cellules de la granulosa, Pourquoi ? Comment ?* »**
Journée scientifique « Impact de l'environnement et de la nutrition sur la fertilité et sur l'enfant »,
Amiens, le 18 janvier 2010

5. COMMUNICATIONS ORALES « GRAND PUBLIC »

- **« *Les perturbateurs endocriniens et leurs conséquences sur la fertilité* »**
Intervention sur invitation réalisée à Amiens le 29 juin 2018 dans le cadre de l'émission intitulée « La question du jour » sur **France Bleu Picardie**

6. POSTERS

- *« Impact des perturbateurs endocriniens sur la fertilité : Etude cas-témoins »*
Cabry-Goubet R, Scheffler F, Noel J, Leconte H, Houette C, Lombart M, Lourdel E, Belhadri N, Devaux A, Desailoud R, Copin H, Benkhalifa M.
Fédération Française d'Etude De la Reproduction (FFER) Lyon, 2018

- *« Le dosage de GH dans le liquide folliculaire est possible : A propos du cas d'une patiente présentant un déficit somatotrope »*
Cabry-Goubet R, Scheffler F, Leclercq E, Lourdel E, Mansouri N, Merviel P, Desailoud R, Benkhalifa M, Bach V, Copin H, Devaux A.
Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens (CHEC) 2014 et Fédération Française d'Etude De la Reproduction (FFER) 2015

- *« Dosages des hormones thyroïdiennes (TSH, T3L, T4L) dans les liquides folliculaires ovariens, étude de faisabilité »*
Scheffler F, Cabry R, Devaux A, Lourdel E, Berthe E, Leclercq E, Merviel P, Copin H.
Fédération Française d'Etude De la Reproduction (FFER) 2013 et Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens (CHEC) 2014

- *« Did oocytes with granular cytoplasm have consequences on IVF outcome and is it possible to detect an impact of environmental factors explaining oocyte aspect? »*
Merviel P, Cabry-Goubet R, Chardon K, Bach V, Brasseur F, Devaux A.
European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) 2014

- *« Corrélation dans les liquides folliculaires des dosages hormonaux (FSH, LH, estradiol, testostérone) aux taux de nicotine et de cotinine. »*
Cabry-Goubet R (a), Chabanne O (a), Corona A (a), Boulard V (a), Stephan-Blanchard E (b), El Esper I (c), Hurtel AS (d), Bach V (b), Merviel P (a), Devaux A (a), Copin H (a).
Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens (CHEC) 2012 et Fédération Française d'Etude De la Reproduction (FFER) 2012

- *« Dosages des marqueurs du tabagisme (nicotine et cotinine) dans les liquides folliculaires, intérêts et faisabilité ».*
Cabry-Goubet R (a), Corona A (a), Stephan-Blanchard E (b), Hurtel AS (c), Bach V (b), Merviel P (a), Denis I (d), Devaux A (a), Copin H (a).
Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens (CHEC) 2011 et Fédération Française d'Etude De la Reproduction (FFER) 2011.

- *« Impact of male smoking on IVF outcome »*
 A.Devaux, P.Demailly, **R.Cabry-Goubet**, F.Brasseur, P.Merviel, H.Copin.
European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Rome 2011

- *« Impact du tabagisme sur les paramètres des tentatives d'AMP »*
 P.Demailly, **R.Cabry-Goubet**, F.Brasseur, P.Merviel, H.Copin, A.Devaux.
Fédération Française d'Etude De la Reproduction (FFER) Deauville, 2009

TITRES

1. CURSUS HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Depuis Septembre 2018 :

Chef de Service Adjointe, Service de « Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie », CHU Amiens.

Depuis Septembre 2014 :

Responsable du CECOS de Picardie, Service de « Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie », CHU Amiens.

Janvier 2017 – Décembre 2017 :

Année de mobilité réalisée dans le cadre d'un Détachement pour Mission de Recherche
Service de « Gynécologie-Obstétrique et de Médecine de la Reproduction »
Hopital Cantonal de Fribourg, Suisse

Depuis Septembre 2014 :

Maître de Conférences Universitaire - Praticien hospitalier
CNU Histologie, Embryologie, Cytogénétique (Section 42-02)
Service de « Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie », CHU Amiens.

Mai 2011 – Aout 2014 :

Praticien Hospitalier-Universitaire
CNU Histologie, Embryologie, Cytogénétique (Section 42-02)
Service de « Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie », CHU Amiens.

Novembre 2010 - Avril 2011 :

Assistant Hospitalo-Universitaire
Service de « Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie », CHU Amiens.

Novembre 2008 - Octobre 2010 :

Chef de Clinique Des Universités, Assistant des Hôpitaux

Service de « Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie », CHU Amiens.

Novembre 2005- Octobre 2008 :

Internat de Gynécologie Médicale,

UFR Médecine Amiens

Inter-CHU réalisé dans le Service de Génétique Clinique du Professeur Munnich,

Unité de diagnostic préimplantatoire (Fédération DPI Clamart-Necker)

Centre Hospitalier Universitaire de Necker, Paris.

2. FORMATIONS ET DIPLOMES OBTENUS

DU « Ethique Médicale en Santé », UFR de Médecine Amiens, Validé en 2016

DIU « Microscopie Electronique : Ultra-structure normale et pathologique »

UFR de Médecine Clermond-Ferrand, Validé en 2015

Master 2, « Systèmes intégrés : Explorations Fonctionnelles, Physiologie, Physiopathologie »

UFR de Médecine Amiens, Validé en 2010

DESC de Médecine de la Reproduction, UFR de Médecine Amiens, Validé en 2009

DES de Gynécologie Médicale, UFR de Médecine Amiens, Validé en 2008

Thèse de Médecine, UFR de Médecine d'Amiens, validée en 2008

« Extension du typage HLA au diagnostic préimplantatoire, le point sur deux années de pratique Française et questions éthiques »

DIU de « Médecine Fœtale », UFR de Médecine de Lille, validé en 2006

DIU de « Gynécologie de l'Enfance et de l'Adolescence »,

UFR de Médecine de Lille, validé en 2005

3. ACTIVITES HOSPITALIERES

Médecine de la Reproduction

Réalisation de consultations et participation aux monitorages échographiques, ponctions ovocytaires, transferts embryonnaires et inséminations intra-utérines

CECOS

- Gestion de l'organisation des dons de gamètes et d'embryons

Coordination clinique de la mise en place du don d'ovocytes (2008) et de l'accueil d'embryons (2010), Responsable de l'UF CECOS depuis septembre 2014

- Participation à la mise en place des consultations de Préservation de Fertilité

Gynécologie Médicale

- Consultations dans le cadre du « Centre de la Ménopause » au sein du Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Amiens
- Coordination de la mise en place d'une consultation pluri-disciplinaire dédiée « Gynécologie et Handicap »
- Coordination et participation aux consultations dédiées « Gynécologie Pédiatrique », en association avec les endocrino-pédiatres du CHU d'Amiens

4. ACTIVITES UNIVERSITAIRES

Enseignements en Histologie et en Embryologie

- Réalisation de cours en PACES et en DFGSM2 et 3
- Réalisation de cours dans les écoles para-médicales

Enseignements en Gynécologie Médicale et Médecine de la Reproduction

- Réalisation de cours en DFASM, en Master 1 et en Maïeutique

Coordination d'enseignements

- Histologie-Embryologie pour l'UFR de Médecine d'Amiens
- UE 2 PACES « Cellules et Tissus »
- UE 8A PACES « Maïeutique »

- Unité d'enseignement (UE) « Des gamètes au blastocyste implanté » dans le Master Recherche, mention Santé : « Interactions moléculaires et pathologies humaines, recherche thérapeutique » (Master 1)
- Unité d'Enseignement « Hormones et Reproduction » en DFGSM 2

Autres responsabilités universitaires

- Coordinatrice associée locale du DES de Gynécologie Médicale avec le Professeur Jean Gondry
- Coordinatrice locale de la FST « Médecine de la Reproduction »
- Référente pour l'UFR de Médecine de la réorientation en PACES
- Membre de la commission PARCOURSUP pour l'UFR de Médecine d'Amiens

5. ACTIVITES DE RECHERCHE

Appartenance à une structure de recherche labélisée :

Membre de l'équipe PERITOX (PERInatalité et risque TOXique),
Unité INERIS, UFR Médecine Amiens (EA 4285-UMI 01)
Responsable : Pr Véronique Bach

Thématique du travail de Thèse :

Impact des facteurs environnementaux (tabac et pesticides) et sur la fertilité.

Encadrements d'étudiants en Master 1 et Master 2

Obtention d'un financement dans le cadre du « Projet Innovations 2018, CHU Amiens »

Avec mise en place d'une UF de Recherche permettant la réalisation d'analyses spermatozoaires complémentaires

Fragmentation de l'ADN spermatique

Index de dénaturation de l'ADN spermatique

Recherche d'ADN libre circulant

Dosage de la PCL-zeta

Suppléante du Dr Elodie Haraux au poste de représentante des doctorants au sein du Conseil de Laboratoire PERITOX

6. PARTICIPATION AUX SOCIETES SAVANTES

Membre du Groupe « Stratégie en AMP » à l'Agence de la Biomédecine

Entrée en septembre 2018

Membre du CHEC (Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens)

Participation au comité scientifique pour la partie Biologie de la Reproduction aux prochaines journées du CHEC 1019 à Rennes

Membre de l'Espace Ethique de Picardie

Spécialisée dans les questions éthiques en lien avec l'assistance Médicale à la Procréation

Trésorière du CECOS de Picardie

Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme

Membre de la Fédération des CECOS

Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme

Membre du GEDO

Groupement d'Etudes sur le Don d'Ovocytes

Membre du GRECOT

Groupe de Recherche et d'Etude sur la Cryoconservation de l'Ovaire et du Testicule

Membre du GEF

Groupe pour l'Etude de la Fécondation in vitro en France

Membre de l'association des Morphologistes

Membre du CREBIOP

Centre Régional d'Etude de Biologie Prénatale

Membre du GREGOP

Groupement Régional des Gynécologues Obstétriciens de Picardie

Lecteur pour le Journal de « Gynécologie-Obstétrique et Fertilité » et pour le Journal « Ethique et Santé »

7. ORGANISATION DE CONGRES ET DE JOURNEES D'ETUDE

- **« Préservation de la Fertilité et Cancers »**
Journée scientifique réalisée à Amiens le 14 juin 2018

- **Congrès annuel de la Fédération des CECOS**
Congrès réalisé à Amiens en Mars 2016

- **« Préservation de la Fertilité et Cancers »**
Journée scientifique réalisée à Amiens le 26 juin 2015

- **CHEC (Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens)**
Congrès réalisé à Amiens en Mars 2013

- **« Impact de l'environnement et de la nutrition sur la fertilité et sur l'enfant »**
Journée scientifique réalisée le 18 janvier 2010 à Amiens

- **FFER (Fédération Française Etude de la Reproduction)**
Congrès réalisé à Amiens en Septembre 2007

1. PUBLICATIONS DANS DES REVUES INDEXEES

- « *Challenges and perspectives of omes and omics in assisted reproductive technologies: from screening to diagnostic* »
Benkhalifa M, Belhadri M, Belloc S, Cabry-Goubet R, Chahine H, Copin H, Miron P, Gurgan T.
Biomed J Sci Tech Res.2018.05.001229. (IF = 3.373)
- « *Effect of gonadotropin types and indications on homologous intrauterine insemination success: a study from 1 251 cycles and a review of the literature* »
Cabry-Goubet R, Scheffler F, Belhadri-Mansouri N, Belloc S, Lourdel E, Devaux A, Chahine H, De Mouzon J, Copin H, Benkhalifa M.
Biomed Research International, 2017; Article ID 3512784, 2017. (IF = 2.583)
- « *New intragenic rearrangements in non-finnish mulibrey nanism* »
Jobic F, Morin G, Vincent-Delorme C, Cadet E, Cabry R, Mathieu-Dramart M, Copin H, Rochette J, Jedraszak G.
American Journal of Medical Genetics A, 2017: 173 (10); 2782-2788. (IF = 2.264)
- « *Comparison of two preventive treatments for patients with recurrent miscarriages carrying a C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation: 5 years experience*»
Merviel P, Cabry-Goubet R, Lourdel E, Lanta S, Amant C, Copin H, Benkhalifa M.
J Inter Medical Research, 2016; 0 (0):1-11. (IF = 1.431)
- « *Comparative prospective study of 2 ovarian stimulation protocols in poor responders: Effect on implantation rate and ongoing pregnancy* »
Merviel P, Cabry-Goubet R, Lourdel E, Devaux A, Belhadri-Mansouri N, Copin H, Benkhalifa M.
Reprod Health, 2015 ; 30 (12) :52. (IF = 1.88)

- **« AMP avec don d'ovocytes »**
Cabry-Goubet R, Scheffler F, Lourdel E, Belhadri N, Receveur A, Maerten I, Devaux A, Benkhalifa M, Copin H, Merviel P.
Revue Prat Med G, 2015 ; 936 (29) : 150-151. (IF= 0.5)

- **« Sperm cryopreservation in adolescents and young adults with cancer: results of the French national sperm banking network (CECOS)**
Daudin M, Rives N, Walschaerts M, Drouineaud V, Szerman E, Koscinski I, Eustache F, Saias-Magnan J, Papaxanthos-Roche A, **Cabry-Goubet R**, Brugnon F, Le Lannou D, Barthélémy C, Rigot JM, Fréour T, Berthaut I, Giscard d'Estaing S, Touati F, Mélin-Blocquaux MC, Blagosklonov O, Thomas C, Benhamed M, Schmitt F, Kunstmann JM, Thonneau P, Bujan L.
Fertil Steril. 2015 ; 103 :478-86. e1. (IF= 3.9)

- **« Les accouchées sont-elles de potentielles donneuses d'ovocytes ? »**
Cabry-Goubet R, Lombart M, Scheffler-Garhieni F, Lourdel E, Carette F, Devaux A, Copin H, Benkhalifa M, Merviel P.
Gynecol Obstet Fertil. 2014 ; 42 (12) :844-848. (IF= 0.5)

- **« Managing infertility in women over 40 »**
Cabry-Goubet R, Merviel P, Hazout A, Belloc S, Dalleac A, Copin H, Benkhalifa M.
Maturitas. 2014; 78(1): 17-21. (IF= 2.67)

- **« How to overcome male infertility over 40's: Influence of paternal age on fertility ».**
Belloc S, Hazout A, Merviel P, **Cabry R**, Chahine H, Copin H, Benkhalifa M.
Maturitas. 2014; 78(1): 22-29. (IF= 2.67)

- **« Une étape nécessaire dans la prise en charge du couple infertile : Inséminations intra-utérines »**
Merviel P, **Cabry R**, Lourdel E, Barbier F, Scheffler F, Mansouri N, Devaux A, Benkhalifa M, Copin H.
Revue Prat. 2014 ; 64 (1) : 87-91. (IF= 0.8)

- **« Facteurs prédictifs de grossesses en cas de transfert de deux embryons au cours de tentatives Top Quality ».**
Cabry-Goubet R, Lourdel E, Brzakowski M, Urrutiaguer-Grenier N, Brasseur F, Demailly P, Devaux A, Copin H, Merviel P.
Gynecol Obstet Fertil. 2013 ; 41(3) : 168-172. (IF= 0.5)

- **« Jusqu'où peut-on aller en don d'ovocytes ? Réflexions sur les risques des grossesses tardives »**
Lombart M, **Cabry R**, Boulard V, Lourdel E, Lanta S, Verhoest P, Copin H, Gondry J, Merviel P.
Gynecol Obstet Fertil. 2013 ; 41(11) : 672-7. (IF= 0.5)

- **« Comment présenter les résultats des centres d'AMP : enquête auprès des professionnels des centres français et application aux résultats du centre d'AMP du CHU d'Amiens».**
Cabry-Goubet R, Boulard V, Lourdel E, Devaux A, Copin H, Belaisch-Allart J, Merviel P.
Gynecol Obstet Fertil. 2012 ; 40(1) : 24-30. (IF= 0.5)

- **« Faut-il vraiment lever l'anonymat des dons de gamètes en France ? »**
Merviel P, **Cabry-Goubet R**, Lourdel E, Brzakowski M, Maerten I, Berthe E, Devaux A, Copin H.
Gynecol Obstet Fertil. 2011 ; 39(2) : 67-9.
(IF= 0.5)

- **« Evaluation des Pratiques Professionnelles dans un centre d'AMP : Comment améliorer la qualité des soins ? »**
Cabry-Goubet R, Lourdel E, Brasseur F, Sanguinet P, Demailly P, Devaux A, Copin H, Merviel. P.
Gynecol Obstet Fertil. 2010 ; 38(10) : 581-7. (IF= 0.5)

- **« *Physiopathology of human embryonic implantation: clinical incidences.* »**
 Merviel P, Lourdel E, **Cabry R**, Boulard V, Brzakowski M, Demailly P, Brasseur F, Copin H, Devaux A.
Folia Histochem Cytobiol. 2009; 47(5): S25-34. (IF= 1.10)
- **« *Risques de la stimulation ovarienne et du prélèvement ovocytaire.* »**
 Merviel P, **Cabry R**, Boulard V, Lourdel E, Olieric MF, Claeys C, Demailly P, Devaux A, Copin H.
Gynecol Obstet Fertil. 2009 ; 37(11-12) : 926-933. (IF= 0.5)
- **« *La révision de la loi de bioéthique : analyse comparative des contributions de différents organismes publics ou professionnels. Assistance médicale à la procréation, recherche sur l'embryon et les cellules souches, banque de sang du cordon ombilical.* »**
 Merviel P, **Cabry R**, Lourdel E, Brasseur F, Devaux A, Copin H.
Gynecol Obstet Fertil. 2009 ; 37(9) : 733-741. (IF= 0.5)
- **« *Utérus cloisonné : place de la septoplastie hystéroscopique* »**
 Lourdel E, **Cabry-Goubet R**, Merviel P, Grenier N, Olieric MF, Gondry J.
Gynecol Obstet Fertil. 2007 ; 35 : 811-818. (IF= 0.5)

2. COMMUNICATIONS ORALES

- **« Stimulations hors FIV »**
 Intervention sur invitation
 Gynécologie Update Refresher, Lausanne 2017 et 2018
- **« *Révision de la loi de bioéthique, les enjeux dans le cadre de la prise en charge en Assistance Médicale à la Procréation* »**
 Intervention sur invitation France Bleu Picardie
 Intervention réalisée à Amiens le 22 mai 2018

- **« Révision de la loi de bioéthique, et si on parlait de l'autoconservation sociétale... »**
 Journée scientifique « Préservation de la Fertilité et Cancers »
 Intervention réalisée à Amiens le 14 juin 2018

- **« Ethique et AMP, des concepts à la pratique clinique »**
 Journée scientifique « Embryons et implantation », Club des jeunes fivistes Nord-Pas de Calais-Picardie-Champagne-Ardennes
 Intervention réalisée à Lille le 01/06/2018

- **« Prise en charge en AMP des femmes seules et des couples de femmes homosexuelles »**
 Animation d'un débat citoyen en association avec le Dr Alain De Broca de l'Espace Ethique de Picardie réalisée à Albert le 16 avril 2018

- **« Connaissance du don par le grand public »**
 Communication orale
 Séminaire interne des CECOS, Amiens le 25 mars 2016

- **« Suivi des grossesses en don, enquête auprès des CECOS »**
 Animation de l'atelier médico-administratif
 Séminaire interne des CECOS, Amiens le 23 mars 2016

- **« Prise en charge de la ménopause, actualités et perspectives »**
 EPU Médecine Générale, Amiens le 24 février 2016

- **« Physiologie de l'implantation : tout ce que les jeunes fivistes ont besoin de savoir ! »**
 Journée scientifique « Embryons et implantation », Club des jeunes fivistes Nord-Pas de Calais-Picardie-Champagne-Ardennes
 Intervention réalisée à Maissemy le 03/07/2015

- **« Préservation de la fertilité féminine : Indications et techniques »**
 Journée scientifique « Préservation de la Fertilité et Cancers »
 Intervention réalisée à Amiens le 26 juin 2015

- **« *Les patientes en suite de naissance connaissent-elles bien le don d'ovocytes ?* »**
 Commission scientifique de la Fédération Nationale des CECOS
 Intervention réalisée à Paris le 28 mai 2015 (Journée scientifique du CECOS).

- **« *Insuffisance Ovarienne Préaturée : Aspects pratiques* »**
 Journées du Collège de Gynécologie Médicale du Nord
 Intervention réalisée à Lille le 10 avril 2015 (Journée du Collège de Gynécologie Médicale du Nord)

- **« *Préservation de la fertilité après cancer, état des lieux CECOS Amiens* »**
 EPU, Laboratoire MSD
 10 octobre 2013, Amiens.

- **« *Préservation de la fertilité après cancer* »**
 GREGOP (Groupement Régional des Gynécologues Obstétriciens de Picardie)
 12 juin 2012, Amiens.

- **« *Que reste-il du THS en 2010 ?* »**
 Gynécologie-obstétrique actualités 2010, les Evénements de l'année
 Session Controverses en Gynécologie-Obstétrique,
 09 janvier 2010, Paris.

- **« *Don et accueil d'ovocytes, accueil et prise en charge des donneuses et des couples receveurs au CECOS d'Amiens* »**
 GREGOP (Groupement Régional des Gynécologues Obstétriciens de Picardie)
 Année 2008, Amiens.

ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AHS	Agricultural Health Study
AMH	Hormone Anti-Mullérienne
AMP	Assistance Médicale à la Procréation
ANSP	Agence Nationale de Santé Publique
AR	Récepteurs aux Androgènes
BLEFCO	Biologistes des Laboratoires d'Etude de la Fécondation et de la Conservation de l'Oeuf
β hCH	β Hormone Chorionique Gonadotrope
BPA	Bisphénol A
CCO	Complexe Cumulo-Ovocytaire
CECOS	Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme
CES	Score Embryonnaire Cumulé
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLCG	Centrally Located Cytoplasm Granulations
CO	Monoxyde de Carbone
CPP	Comité de Protection des Personnes
DBCP	Dibromochloropropane
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DES	Diéthylstilbestrol
DNC	Délai Nécessaire pour Concevoir
ECBU	Etude Cyto-Bactériologique des Urines
EPA	Environmental Protection Agency
ER	Récepteurs aux Estrogènes
FCS	Fausse-Couche Spontanée
FISH	Flurescent In Situ Hybridation
FIV	Fécondation In Vitro
FSH	Hormone Folliculostimulante

GEU	Grossesse Extra-Utérine
GREPP	Groupe Régional des Etudes Phyto-sanitaires de Picardie
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HIV	Virus de l'Immunodéficience Humaine
hMG	Gonadotrophine Urinaire Humaine
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GP	Globule Polaire
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
IU	Insémination Intra-Utérine
IMC	Indice de Masse Corporelle
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
INVS	Institut National de Veille Sanitaire
LF	Liquide Folliculaire
LH	Luteinising Hormone
NTP	National Toxicology Programme
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds Ratio
PBB	Polybrominatedbiphényles
PCB	Polychlorobiphényles
PE	Perturbateur Endocrinien
PFC	Composés Per-Fluorés
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PN	Pro Nucléi
PNRPE	Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens
PNSE	Plan National Santé Environnement
PPS	Produits Phyto-Sanitaires
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals
ROS	Reactive Oxygen Species

SA	Semaine d'Aménorrhée
SAU	Surface Agricole Utile
SDI	Sperm Denaturation Index
TMS	Test de Migration Survie
TUNEL	Terminal Uridine Nick-End Labeling
XA	Xéno-Androgènes
XE	Xéno-Estrogènes
XH	Xéno-Hormones

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux PE industriels de notre quotidien, localisation et effets connus sur l'organisme humain

Source personnelle

Tableau 2 : Classification des principaux pesticides utilisés en fonction de leur composition chimique

Source personnelle

Tableau 3 : Caractéristiques des couples en fonction de leur statut tabagique

Source : « Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives »

Tableau 4 : Caractéristiques des paramètres de l'AMP en fct du statut tabagique des couples

Source : « Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives »

Tableau 5 : Résultats de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples

Source : « Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives »

Tableau 6 : Etude de la comparabilité des groupes

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Tableau 7 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et exposition tabagique des patientes

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Tableau 8 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et dosages de CO dans l'air expiré des patientes

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Tableau 9 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et valeurs de FSH des patientes

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Tableau 10 : Etude de la corrélation des taux de nicotine dans les liquides folliculaires aux paramètres de l'AMP

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Tableau 11 : Tableau d'interprétation des valeurs de CO dans l'air expiré

Source : Manuel d'utilisation COBABY ®

Tableau 12 : Analyse de la population et comparabilité des groupes

Source : « Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles »

Tableau 13 : Exposition de la population étudiée au tabagisme

Source : « Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles »

Tableau 14 : Exposition toxique professionnelle de la population étudiée

Source : « Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles »

Tableau 15 : Exposition toxique domestique de la population étudiée

Source : « Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles »

Tableau 16 : Facteurs d'exposition domestique liés au lieu de vie de la population étudiée

Source : « Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles »

Tableau 17 : *Caractéristiques des femmes en fonction du statut tabagique des couples*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 18 : *Caractéristiques des hommes en fonction du statut tabagique des couples*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 19 : *Caractéristiques des femmes en fonction de leur statut tabagique*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 20 : *Caractéristiques des tentatives en fonction du statut tabagique des femmes*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 21 : *Caractéristiques des paramètres spermatiques en fonction du statut tabagique des hommes*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 22 : *Caractéristiques féminines en fonction de la notion d'exposition ou non*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 23 : *Caractéristiques masculines en fonction de la notion d'exposition ou non*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 24 : *Caractéristiques des tentatives en fonction de l'exposition tabagique ou non des couples*

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 25 : Caractéristiques des issues de tentatives en fonction de l'exposition tabagique ou non des couples

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 26 : Analyse multivariée sur le critère de la réalisation ou non d'une congélation embryonnaire

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 27 : Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et statuts tabagiques des couples

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 28 : Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et caractéristiques féminines

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 29 : Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et issues des grossesses

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

Tableau 30 : Corrélation entre les différents paramètres des tentatives d'AMP et les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires

Source : « Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Action directe possible d'un PE via un récepteur hormonal membranaire

Source : S. Desmots, Environ. Risques Santé [4]

Figure 2 : Schéma des différentes Voies, Types et Modes d'exposition aux perturbateurs endocriniens

Source : Thèse Science Elodie Haraux

Figure 3 : Schéma de l'axe gonadotrope chez la femme

Source : planet-vie.ens.fr

Figure 4 : Schéma de l'axe gonadotrope chez l'homme

Source : bio-top.net

Figure 5 : Le syndrome de Dysgénésie Testiculaire selon Skakkebaek

Source : fivfrance.com

Figure 6 : Régression linéaire entre les taux de nicotine dans les liquides folliculaires et l'exposition tabagique des patientes.

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Figure 7 : Régression linéaire entre les taux de cotinine dans les liquides folliculaires et l'exposition tabagique des patientes.

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Figure 8 : Régression linéaire entre les taux de nicotine dans les liquides folliculaires et les dosages de CO dans l'air expiré des patientes.

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Figure 9 : Régression linéaire entre les taux de cotinine dans les liquides folliculaires et les dosages de CO dans l'air expiré des patientes.

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Figure 10 : Régression linéaire entre les taux de nicotine dans les liquides folliculaires et les valeurs de FSH des patientes

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Figure 11 : Régression linéaire entre les taux de cotinine dans les liquides folliculaires et les valeurs de FSH des patientes

Source : « Analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires »

Figure 12 : Photographie du CO tester utilisé dans notre étude

Source : Photographie personnelle

Figure 13 : Photographie d'un complexe cumulo-ovocyttaire après tri des ovocytes

Source : Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

Figure 14 : Photographie d'un ovocyte après décoronisation

Source : Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

Figure 15 : Photographie des tubes anonymisés avant centrifugation

Source : Photographie personnelle

Figure 16 : Photographie d'un tube après centrifugation

Source : Photographie personnelle

Figure 17 : Photographie des tubes avant congélation

Source : Photographie personnelle

RESUME

Objectifs

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer l'impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité de couples. Les objectifs secondaires sont d'évaluer l'impact du tabagisme sur les paramètres d'AMP de couples infertiles et d'établir s'il existe une corrélation des dosages de nicotine (principal composé additif de la fumée de cigarette) et de cotinine (principal métabolite de la nicotine) dans les liquides folliculaires au statut tabagique des patientes et aux paramètres des tentatives d'AMP réalisées.

Matériel et Méthode

Suite à la réalisation de différentes études observationnelles, nous avons mis en place une étude comparative, descriptive, monocentrique et prospective de deux groupes de patients (Couples Infertiles et Fertiles) au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie du CHU d'Amiens. Les patients inclus ont répondu à un questionnaire d'exposition toxique. Il a également été mis en place une bibliothèque (sang, urines et cheveux pour tous les couples, liquides folliculaires et plasmas séminaux pour les couples infertiles) afin de réaliser des dosages spécifiques de toxiques (nicotine, cotinine et pesticides).

Résultats

L'ensemble des travaux réalisés nous ont permis d'objectiver un tabagisme actif féminin significativement plus important dans notre population de femmes infertiles ainsi qu'un tabagisme passif aux différents stades de la vie significativement plus important chez les couples infertiles. Nous avons d'autre part mis en évidence une diminution des taux de fécondation en cas de tabagisme masculin et une altération de la qualité du développement embryonnaire précoce en cas de tabagisme féminin. Les dosages réalisés dans les liquides folliculaires ont retrouvé une meilleure corrélation des taux de cotinine par rapport aux taux de nicotine ainsi que la présence de dérivés de la cotinine dans les liquides folliculaires de femmes exposées passivement au tabac.

Dans le cadre de l'analyse de l'exposition des couples aux pesticides, nous avons mis en évidence une corrélation entre la zone géographique hautement exposée aux pesticides des couples et le taux d'ovocytes en métaphase II présentant un cytoplasme granuleux. Chez ces couples, une augmentation des taux de FCS était également observée. Nous noterons également que plus de couples infertiles vivaient à proximité de champs de maïs comparativement à une population de couples fertiles.

En rapport avec l'exposition plus global aux perturbateurs endocriniens, nous avons pu mettre en évidence une surexposition des patientes prises en charge en AMP comparée à la population générale sur l'ancienneté du type d'habitation et la réalisation de plus de six teintures de cheveux chez les femmes. La consommation régulière d'eau du robinet est apparue comme un facteur significatif caractérisant la population fertile.

Conclusion

Le tabagisme et l'exposition aux pesticides sont deux éléments clés à prendre en compte dans la prise en charge de couples infertiles.

Mots clés : *Tabac, Pesticides, Perturbateurs endocriniens, Infertilité, Assistance Médicale à la Procréation, Liquides folliculaires*

ABSTRACT

Objectives

The main aim of our PhD subject was the evaluation of smoking and pesticides exposure impacts on infertile couples seeking for ART fertility. Secondary objectives were the investigation of smoking impact on infertile couples IVF parameters and to establish if there is any relation between nicotine (main cigarettes compound) and cotinine (main nicotine metabolite) state on follicular fluids of smoking and IVF parameters.

Method

This work was based on different observational studies, after which we proposed a comparative, descriptive, monocentric and prospective study of two groups of our patient: fertile and infertile. For this, we included patients who responded to a toxical exposition questionnaire, with the set up of samples banking including blood, urine, hairs, follicular fluids and seminal plasma to test nicotine, cotinine and pesticides levels.

Results

Our primary observations reported a clear relation between the impact of smoking on women infertility. We observed also an important passive contribution of smoking exposition on infertile couples. Our data showed a decrease of fertilization rate diminution from smoking men and lower quality of early embryo from smoking women. The analysis of nicotine and cotinine levels in follicular fluids showed better correlation between cotinine with the impact of active and/or passive smoking than nicotine.

About pesticides exposures, we observed significant higher infertile couples leaving near corn fields with clear correlation between high level of pesticides geographic zone exposition and centrally granulated metaphase II oocyte cytoplasm and more pregnancies losses in case of pregnancy.

Concerning endocrine disruptor exposition, we showed a upper exposition of infertile compared to fertile couples on older life's place and on more than six women hair dye realisation. Regular tap water was associated with infertile couples rate.

Conclusion

Smoking and pesticides exposure are two important parameters to be considered and investigated during infertile couples management.

Keywords : *Smoking, Pesticides, Endocrine disruptors, Infertility, ART, Follicular fluids*

PREMIERE PARTIE
CONTEXTUALISATION DE LA PROBLEMATIQUE

I. DEFINITION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1. Définition des hormones, du système endocrinien et des perturbateurs endocriniens

Les hormones sont des substances chimiques médiatrices, transportées dans le sang, permettant d'exercer une action spécifique sur un organe. Elles sont sécrétées par différentes glandes du corps humain : thyroïde, thymus, foie, pancréas, hypophyse, hypothalamus, estomac, surrénales, reins, ovaires et testicules.

Le système endocrinien est un système de communication de l'organisme constitué de différentes glandes régulant de nombreuses fonctions physiologiques par l'intermédiaire des hormones sécrétées dans la circulation sanguine. De manière normale, l'hormone va agir en se fixant à son récepteur dans les cellules du tissu cible. Après liaison, le complexe hormone-récepteur est internalisé au sein du noyau de la cellule puis se fixe sur une région spécifique du promoteur du gène hormono-dépendant entraînant l'expression du gène.

La notion d'« Endocrine Disruptor », traduite en français sous les termes de Perturbateur Endocrinien (PE) apparaît en 1991, citée pour la première fois par Theo Colborn au cours de la conférence de Wingspread [1] : Un PE est défini comme « une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets pathologiques sur celui-ci ou sur sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale » [2], éléments maintenus dans la dernière définition par l'OMS en 2002 [3].

2. Mécanismes d'action des PE

Les PE peuvent agir selon différents mécanismes d'action à chaque étape du fonctionnement hormonal. Ils peuvent ainsi se fixer aux récepteurs d'hormones naturelles (Actions directes via les récepteurs hormonaux) ou interferer avec les mécanismes de production ou de régulation de ces celles-ci ou de leurs récepteurs (Actions indirectes des PE).

▪ Actions directes des PE via les récepteurs hormonaux

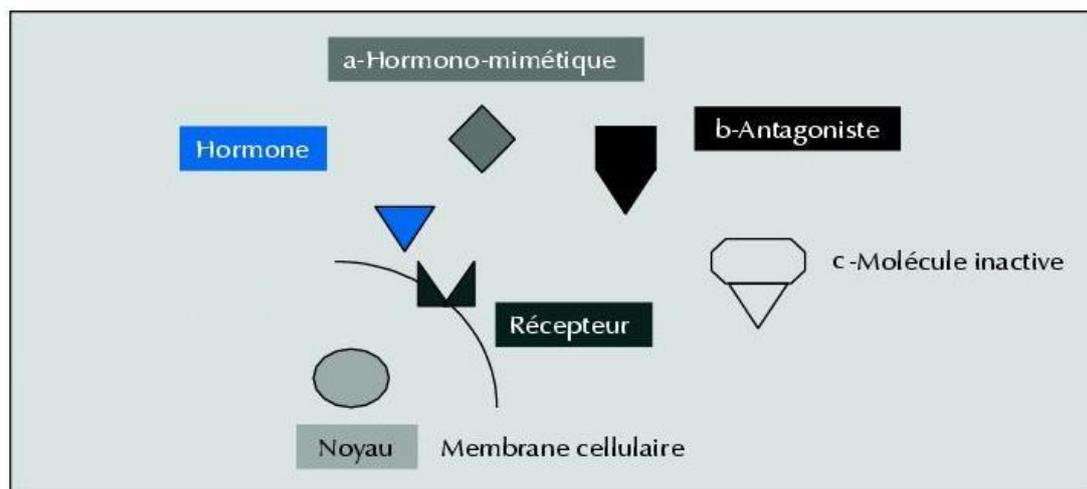
L'action des PE est alors médiée par les récepteurs hormonaux membranaires ou nucléaires. Les PE peuvent ainsi, par leur fixation aux récepteurs hormonaux, agir :

- Par un effet agoniste en mimant les effets des hormones naturelles
- Par un effet antagoniste en bloquant les effets des hormones naturelles

La figure 1 représente l'action directe possible d'un PE via un récepteur hormonal membranaire.

Figure 1 : Action directe possible d'un PE via un récepteur hormonal membranaire

Source : S. Desmots, Environnement, Risques et Santé [4]



▪ Actions indirectes des PE

Ils peuvent également agir :

- En altérant la structure des hormones naturelles (interférences avec les activités enzymatiques concourant à la synthèse hormonale)
- En altérant les taux de récepteurs hormonaux disponibles
- En interférant avec le transport des hormones naturelles (interférences avec l'internalisation ou la liaison à l'ADN du complexe hormone-récepteur)
- En interférant avec l'élimination des hormones naturelles

Par ces différents mécanismes d'actions (directs ou indirects), les PE perturbent ainsi la production, la sécrétion, le stockage, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles, modifiant leurs concentrations dans l'organisme [5].

3. Classification des PE

On dénombre aujourd'hui plus d'un millier de PE dans l'environnement. Les PE peuvent être d'origine naturelle ou artificielle (ils sont alors dits de synthèse).

▪ **PE d'origine naturelle**

Parmi les PE d'origine naturelle, on distingue :

- Les phyto-œstrogènes : présents dans les graines de soja, ils le sont également dans les graines de lin ou de luzerne ;
- Les fongo-œstrogènes également appelés myco-oestrogènes : ils sont sécrétés par des champignons et des moisissures se développant sur les plantes durant leur culture et leur stockage. Ils se retrouvent essentiellement dans le blé, le maïs, le sorgho, l'avoine et le fourrage (exemple de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les silos à céréales).

▪ **PE artificiels (PE dits de Synthèse)**

Les PE artificiels (PE dits de Synthèse) sont synthétisés par le milieu industriel. On distingue :

- Des substances chimiques utilisées dans un cadre pharmaceutique comme les Estrogènes contenus dans les contraceptifs (17 α -éthynylestradiol)
- Diverses substances chimiques se retrouvant dans notre environnement quotidien comme les produits phytosanitaires, les plastifiants (bisphénol A, phtalates, parabène), les dioxines ou apparentés (polychlorobiphényles), les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), ou les retardateurs de flammes.

Les PE artificiels de notre environnement quotidien sont retrouvés dans **les habitations** (peintures, solvants, moquettes), **l'alimentation** (dioxines et produits phytosanitaires), **les emballages alimentaires** et **les objets de puériculture** (Bisphénol A, BPA), **les produits ménagers** (parabenes), **les plastiques** (Phtalates) et **les cosmétiques** (Parabenes et triclosan).

Les principaux PE artificiels de notre environnement quotidien, ainsi que leur localisation et leurs effets connus sur l'organisme humain, sont présentés dans le tableau 1 (Tableau 1 : Principaux PE industriels de notre quotidien, localisation et effets connus sur l'organisme humain, source personnelle).

Tableau 1 : Principaux PE industriels de notre quotidien, localisation et effets connus sur l'organisme humain, source personnelle

Nom	Molécules et issu du produit	Localisation au quotidien	Conséquences sur l'organisme
Bisphénol A (BPA)	Œstrogène de synthèse	Boites de conserve, canettes, plastiques, tickets de caisse	Troubles du comportement et de la reproduction, cancers hormono – dépendants
Dioxines	Produit de combustion	Alimentation : viandes, poissons, lait	Malformations congénitales, toxicité fœtale, altération du développement de l'enfant
Composés perfluorés (PFC)	A pour propriété de repousser l'eau	Ustensiles de cuisine, téflon, crèmes corps, emballages alimentaires, peintures, eau robinet	Bébé de petit poids à la naissance, imite les œstrogènes et interagit avec la glande thyroïdienne
Métaux lourds	Plomb, Cadmium Mercure	Alimentation, eau, cosmétiques, tabac, colorants, engrais	RCIU chez le fœtus, retards mentaux chez l'enfant, dysfonctionnement sexuel
Parabènes	Antibactériens et antifongiques	Shampoings, mousse à raser, produits ménagers, crèmes hydratantes, médicaments, aliments	Dysfonctionnement des fonctions de la reproduction
Phtalates	Plastifiants dont PVC (Polychlorure de vinyle)	Ballons, cosmétiques, parfum, nappes, rideaux de douche, lubrifiants, colles	Auraient un effet sur le développement du fœtus et du nouveau-né et sur la fertilité
Triclosan	Antibactériens et antifongiques	Dentifrices, déodorants, literies, sacs poubelle, eau robinet	Bloquerait la production d'œstrogènes
PBB / PCB	Retardateurs de flammes, isolants	Micro-ondes, eau, Peintures, alimentation	Accumulation dans l'environnement, Toxicité générale

4. Voies, Types et Modes d'exposition aux PE

La large utilisation des PE conduit à retrouver de faibles quantités de ces produits, appelés résidus, dans notre environnement, en particulier dans l'air, dans le sol et dans l'eau.

▪ Différentes Voies d'exposition aux PE

L'exposition humaine aux PE peut se faire par trois voies dites de « pénétration dans l'organisme » :

- La voie digestive : Correspond à l'ingestion de produits contaminés à partir de l'eau et du sol ;
- La voie respiratoire : Correspond à l'inhalation des substances volatiles contenues dans l'air ;
- La voie cutanéomuqueuse : Correspond au contact direct ou indirect sur la peau non protégée de substances contenues dans l'air ou l'eau.

▪ Différents Types d'exposition aux PE

L'exposition aiguë s'observe principalement lors d'un accident d'utilisation.

Les manifestations de l'exposition aiguë sont très variables en fonction de la toxicité, de la voie de pénétration dans l'organisme, des caractéristiques et de la quantité de produit.

L'exposition chronique aux PE correspond à des expositions répétées généralement à faibles doses de ces produits, qui s'accumulent dans l'organisme pendant un délai de quelques semaines à plusieurs années. Aux Etats-Unis, il a ainsi été retrouvé des traces de pesticides ou de leurs métabolites plasmatiques ou urinaires chez 90 % d'une population testée [6].

▪ Différents Modes d'exposition aux PE

L'exposition aux PE peut être professionnelle et concerne de nombreux secteurs d'activités : En France, un salarié sur trois se déclare exposé professionnellement à des produits chimiques en 2010 (Chiffre INRS 2015), aussi bien dans les domaines de l'industrie chimique, de l'artisanat, de l'agriculture ou de la coiffure. Les principales voies d'exposition professionnelle sont les voies respiratoires et cutanées.

En dehors du cadre professionnel, nous sommes tous concernés par l'exposition dite domestique, liée au cadre et aux habitudes de vie. L'alimentation, les activités domestiques et l'environnement sont autant de sources additionnelles d'exposition aux PE. La population générale est de ce fait principalement exposée via la voie digestive par la consommation d'eaux et de denrées alimentaires contaminées, mais également par le fait de résider au voisinage de zones traitées par des pesticides ou à proximité d'usines.

Les équipements de protection individuels dans le cadre du domicile ne sont pas toujours utilisés comme dans les milieux professionnels où des réglementations de protection au travail les rendent obligatoires.

La figure 2 ci-dessous présente une synthèse des « Différentes Voies, Types et Modes d'exposition aux PE : Exemple de la femme enceinte ».

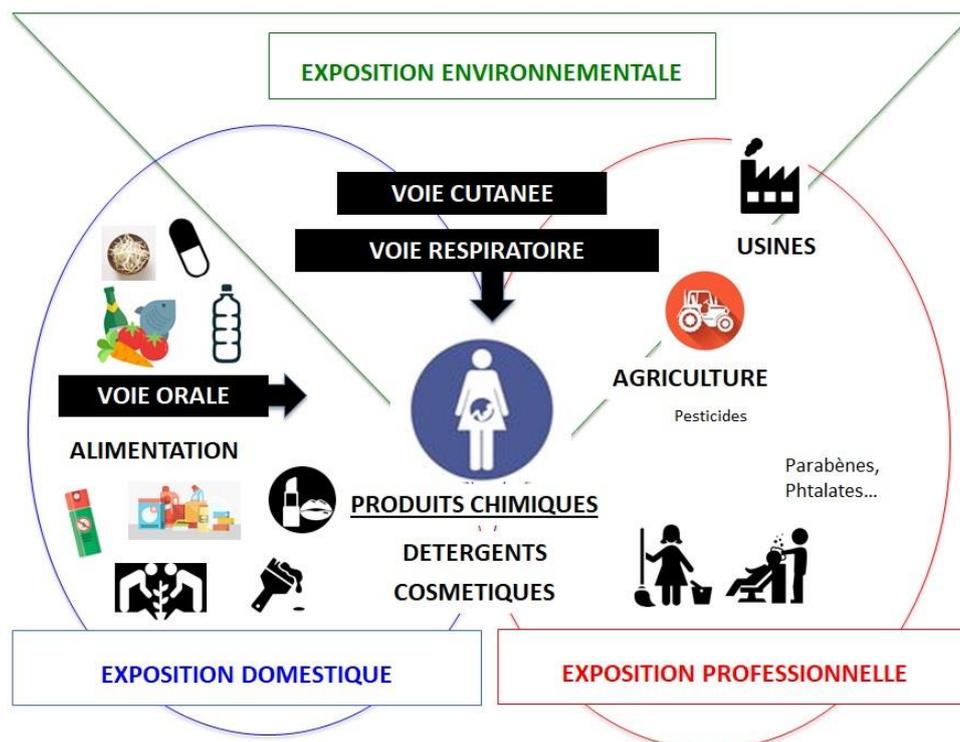


Figure 2 : Schéma des différentes Voies, Types et Modes d'exposition aux perturbateurs endocriniens, Exemple de la femme enceinte, Source : Thèse Science Elodie Haraux

5. Notions de toxicologie

En toxicologie, afin qu'une substance soit reconnue comme PE, il est important d'identifier les mécanismes et les effets que cette substance entraîne sur les organismes vivants. L'étude des mécanismes d'action des PE correspond à la docimologie, les PE se fixent aux récepteurs d'hormones naturelles ou interfèrent avec les mécanismes de production ou de régulation de ces celles-ci ou de leurs récepteurs selon des mécanismes directs ou indirects comme nous l'avons déjà présenté (cf 1.2 Mécanismes d'action des PE).

De nombreux effets attribués aux PE sont observés dans des études expérimentales chez l'animal. Toutefois, elles soulèvent, dans de nombreux cas, la question de l'extrapolation des résultats à des effets chez l'homme, notamment pour des expositions à de faibles niveaux de concentration. Classiquement, en toxicologie, on admet que les effets d'un toxique peuvent suivre deux modèles : un modèle dose-dépendant linéaire, où les effets sont fonction de la dose, ou un modèle tout-ou-rien, où les effets se manifestent au-delà d'un seuil. Ces modèles permettent aux organismes de santé publique d'établir des seuils réglementaires par produit.

L'effet toxique du perturbateur endocrinien

(relation dose-effet également appelée relation exposition-réponse)

ne se caractérise pas par une exposition toxique unique et majeure mais par une exposition à une multitude de produits à faibles doses interagissant entre eux.

C'est pourquoi la présence, même en quantité très infime de PE, peut entraîner un dérèglement de l'équilibre hormonal, par un mécanisme d'addition de doses :

C'est l'effet combiné de doses, également appelé « effet cocktail ».

C'est pour cette raison que plusieurs composés à faibles doses agissant sur les mêmes mécanismes biologiques pourraient ensemble perturber l'organisme sans que chacun, pris isolément, n'ait d'effet. Ainsi définit-on des coexpositions dont les effets peuvent se potentialiser ou, à l'inverse, s'annuler.

Il semblerait d'autre part que la courbe dose-effet caractérisant l'effet des PE soit en « U inversé » traduisant un effet non linéaire qui pourrait apparaître à des doses faibles et disparaître à fortes doses. Le risque est de considérer qu'en l'absence d'effet à forte dose, une substance n'aura pas d'effet à faible dose.

Pour comprendre la complexité des effets potentiels des PE, il est également important de préciser, que ceux-ci se caractérisent par leur caractère lipophile (soluble dans les graisses) et s'accumulent donc dans les tissus adipeux correspondant ainsi à la notion de bioconcentration. Les PE ainsi stockés peuvent être libérés de manière discontinue et cumulée dans l'organisme.

Ces éléments rendent difficiles l'évaluation des effets des PE, ceux-ci n'étant pas forcément dépendants d'une dose donnée, mais de mécanismes plus complexes, rendant rares l'effet isolé d'un perturbateur endocrinien unique. La compréhension des effets des PE demande ainsi d'adopter une vision intégrative en replaçant l'homme dans son environnement, mais également de prendre en compte l'exposition de l'individu à un mélange de substances chimiques et de comprendre leurs interactions au sein de l'organisme humain sur le long terme, dès la période du développement foeto-embryonnaire.

La connaissance des effets des PE se heurte donc aux limites de la toxicologie classique et aux méthodes conventionnelles d'évaluation des risques, en particulier du fait des longs délais d'action potentiels et des expositions difficiles à quantifier.

6. PE et Santé humaine

Les scientifiques ont constaté une recrudescence de certains cancers (sein, prostate, testicules, thyroïde), de maladies hématologiques néoplasiques (lymphomes de Hodgkin, leucémie, myélome multiple), de pathologies neurologiques (maladie de Parkinson, d'Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique) et d'anomalies touchant les organes reproductifs (malformations congénitales de type hypospadias et cryptorchidie [7,8], avances pubertaires [9]) notamment dans des zones agricoles [10]. L'augmentation rapide de la fréquence de ces anomalies ainsi que leurs recrudescences particulièrement ciblées à des aires géographiques d'exposition laissent supposer que des facteurs environnementaux et/ou des changements de mode de vie pourraient être impliqués dans leur genèse.

Les PE sont donc des polluants environnementaux ubiquitaires auxquels la population générale est exposée. Parmi celle-ci, les couples en âge de procréer peuvent être contaminés directement et/ou indirectement par de nombreuses voies d'exposition. L'alimentation, l'environnement, leur activité professionnelle ou extraprofessionnelle peuvent les exposer aux substances à activité de PE.

II. IMPACT DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LA FERTILITE

1. Prise de conscience de l'impact des PE sur la Fertilité

En 1962, la biologiste américaine Rachel Carson dénonçait, dans son livre « *Silent Spring* » les effets de l'épandage massif du DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), insecticide puissant, sur la fertilité de divers oiseaux, en particulier des aigles des grands lacs aux Etas-Unis [11]. En 1985, ont été rapportées des anomalies du développement gonadique accompagnées de troubles de la sécrétion androgénique chez des alligators vivant dans un lac en Floride, pollué par un métabolite du DDT, le DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène) [12] tandis qu'en Grande-Bretagne, les poissons mâles vivant en aval d'une station d'épuration présentaient des caractères femelles.

En 1976, l'explosion d'une usine chimique provoque la dispersion d'un nuage de dioxine sur la région de Seveso en Italie. Les études sur la cohorte de Seveso mettent en avant une augmentation de l'incidence de l'endométriose, source d'infertilité, associée à une élévation des taux de dioxine plasmatique, et une perturbation du sex-ratio dans les mois suivant l'accident avec un ratio observé de 48 naissances de filles pour 26 de garçons. Le suivi des hommes exposé dans l'enfance a montré une baisse de la numération et de la mobilité spermatique avec baisse de l'oestradiolémie et élévation de la FSH plasmatique à l'âge adulte [13].

L'impact des PE sur la fertilité animale est désormais reconnu, posant la question de leurs effets sur la fertilité humaine [14], et ce d'autant plus qu'est observée une augmentation croissante du nombre de couples infertiles [15].

L'infertilité est définie comme l'impossibilité d'obtenir une grossesse après douze mois de rapports sexuels réguliers non protégés. Celle-ci toucherait près de 80 millions de personnes dans le monde. Dans les pays occidentaux, il est admis qu'un couple sur six consulte actuellement pour des difficultés à procréer [16].

2. Définition des Xéno-Hormones : Xéno-Estrogènes et Xéno-Androgènes

Les xénohormones (XH) sont les PE qui interagissent avec les hormones endogènes de l'axe gonadotrope, responsable de la différenciation sexuelle et de la reproduction.

L'ensemble des organes de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique sont concernés :

- **Chez la femme** : hypothalamus, hypophyse, ovaires et tissus cibles sensibles aux estrogènes (endomètre, seins, peau et ses annexes), représentés sur la figure 3 (Figure 3 : Schéma de l'axe gonadotrope chez la femme)
- **Chez l'homme** : hypothalamus, hypophyse, testicules et tissus cibles sensibles aux androgènes (prostate, peau et ses annexes), représentés sur la figure 4 (Figure 4 : Schéma de l'axe gonadotrope chez l'homme)

Figure 3 : Schéma de l'axe gonadotrope chez la femme
Source : planet-vie.ens.fr

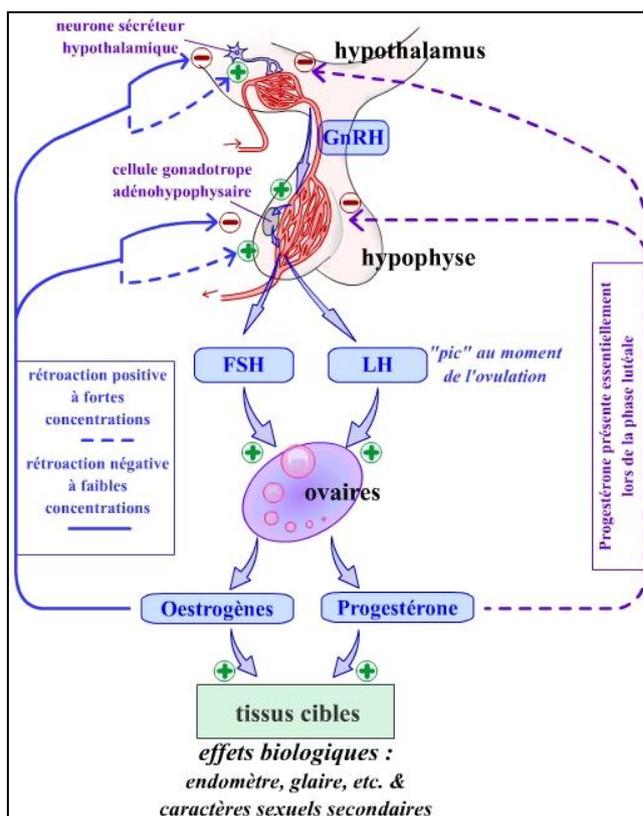
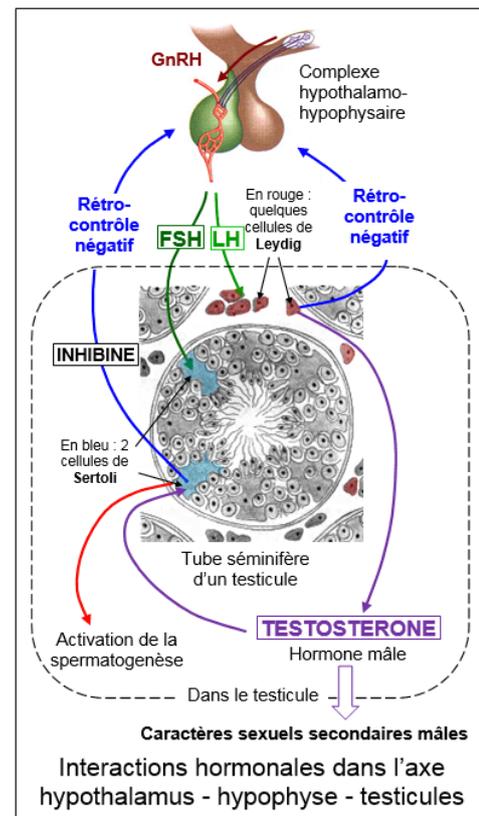


Figure 4 : Schéma de l'axe gonadotrope chez l'homme
Source : bio-top.net



Les hormones naturelles concernées sont les androgènes et les estrogènes (dérivés des androgènes). L'action des XH sur ces hormones est principalement liée à leurs liaisons avec les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes (Récepteurs AR = Récepteurs des androgènes et Récepteurs ER = Récepteurs des estrogènes), via un mécanisme d'action direct.

Les Xéno-Hormones (XH) interagissant avec les récepteurs aux estrogènes sont qualifiés de Xéno-Estrogènes (XE)

Les XH de type oestrogénique peuvent causer des anomalies structurelles ou fonctionnelles, en particulier chez le mâle dans le sens d'une féminisation

Les XH de type anti-oestrogénique ne donneront pas d'anomalies structurelles dans le sens d'une masculinisation chez les femelles mais peuvent conduire à des anomalies fonctionnelles chez celles-ci.

Les Xéno-Hormones (XH) interagissant avec les récepteurs aux androgènes sont qualifiés de Xéno-Androgènes (XA)

Les XH de type androgénique peuvent causer des anomalies structurelles ou fonctionnelles, en particulier chez la femelle dans le sens d'une masculinisation

Les XH de type anti-androgénique peuvent causer des anomalies structurelles ou fonctionnelles, en particulier chez le mâle dans le sens d'une féminisation.

3. Périodes d'exposition critique aux Xéno-Hormones

Il existe 3 périodes considérées comme « critiques » en ce qui concerne l'exposition aux xéno-hormones, et plus généralement aux PE : la conception, la gestation (en particulier entre la 3^{ème} et la 12^{ème} semaine de développement embryonnaire avec la mise en place et la différenciation des organes génitaux) et la puberté. Ces différentes périodes sont considérées comme des périodes de vulnérabilité.

Le fœtus est particulièrement vulnérable aux PE, en raison de sa croissance rapide, de la sensibilité de ses organes en développement, de l'immaturité de ses voies métaboliques et de ses défenses enzymatiques.

4. Xéno-Hormones, Effet transgénérationnel et Empreinte épigénétique

L'effet des XH peut se retrouver sur plusieurs générations, comme de nombreux modèles animaux l'ont prouvé [17, 18, 19]. L'exposition à faibles doses de rates gestantes à la vinclozoline, un antifongique antiandrogénique ou au métoxychlore, un pesticide organochloré, durant la phase de détermination du sexe gonadique a induit une diminution des paramètres spermatiques et de la fertilité chez le rat adulte. Ces effets ont été transmis aux générations suivantes (jusqu'à la 4^{ème} génération) par altération de la méthylation de l'ADN au niveau des lignées germinales, traduisant des modifications survenant au niveau de l'épigénome [20, 21, 22, 23].

Nous citerons dans l'espèce humaine l'exemple du diéthylstilbestrol ou DES, commercialisé en France sous le nom de distilbène®, médicament initialement utilisé pour éviter la survenue des fausses couches spontanées du premier trimestre chez les femmes enceintes, à l'origine d'anomalies anatomiques des voies génitales féminines, de cancers du vagin et de l'utérus et d'infertilité chez les filles des femmes exposées. Chez les garçons de femmes exposées, il a également été découvert un risque plus élevé d'hypospades, de cryptorchidies, d'atrésies de l'œsophage ainsi que de cancers du testicule. Ce médicament, utilisé à partir de 1948 a été retiré du marché français en 1977.

Le suivi des familles de patientes exposées au DES a permis de mettre en évidence la survenue de ces anomalies à la deuxième génération (petits-enfants de femmes exposées), en particulier de tumeurs vaginales chez les petites-filles et d'hypospades chez les petits-garçons.

5. Impact des Xéno-Hormones sur la Fertilité Masculine

Dans les années 1990, le danois Niels Skakkebaek a analysé les études consacrées à la qualité du sperme dans une grande méta-analyse et a constaté que le nombre de spermatozoïdes aurait diminué de moitié depuis 1930 [24]. Ce même auteur a regroupé sous le terme de « dysgénésie testiculaire » [25], les trois entités suivantes : malformations de la sphère uro-génitale du jeune garçon (hypospade, cryptorchydie, hypotrophie testiculaire), cancers du testicule et oligo-asthéo-tératospermie, leur attribuant une physiopathologie commune avec pour dénominateur commun les PE (Figure 5).

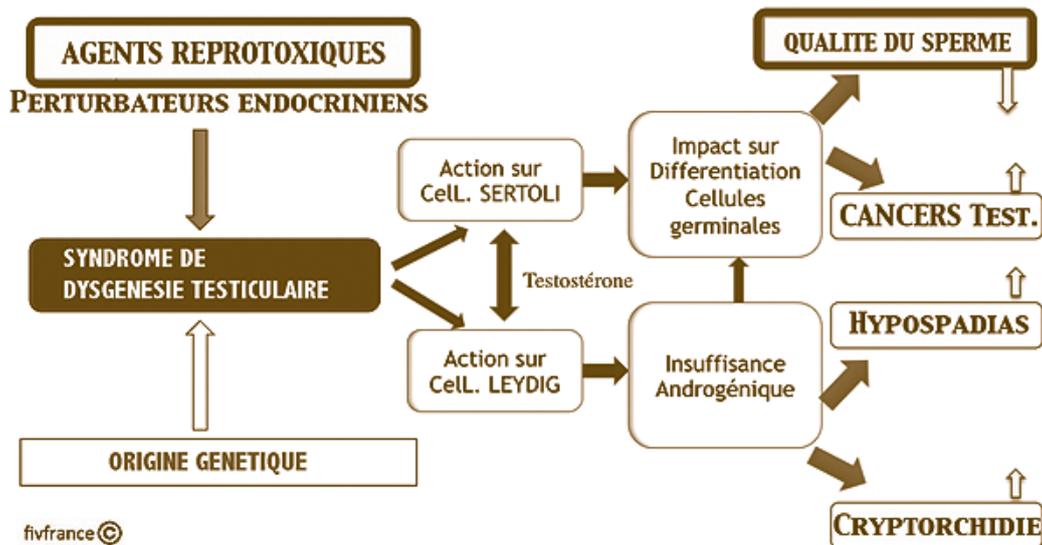


Figure 5 : Le syndrome de Dysgénésie Testiculaire selon Skakkebaek,

Source Fivfrance.com

D'autres études, en particulier françaises, ont conforté ces résultats, retrouvant un déclin du nombre de spermatozoïdes constant de 2.1% par an [26, 27]. Une étude menée par l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS) constate que la plus forte diminution du taux spermatique concerne les hommes résidant dans les régions d'Aquitaine, de Bourgogne et de Rhône-Alpes, trois régions fortement viticoles, la viticulture étant l'activité agricole la plus consommatrice de pesticides.

D'autres études issues de la littérature sont en faveur de l'impact des PE sur la fertilité masculine : la présence urinaire de Bisphénol A, composé de synthèse retrouvé dans les bouteilles plastiques, les canettes et autres contenants alimentaires, serait corrélée à une diminution de la concentration, de la vitalité et de la mobilité spermatique [28].

Fort de ces différents éléments, l'hypothèse est émise d'une responsabilité, au moins partielle, des PE dans le « déclin séculaire de la qualité du sperme » et le syndrome de dysgénésie testiculaire et donc, potentiellement, dans certains troubles de la fertilité humaine.

L'augmentation rapide de la fréquence de ces anomalies ainsi que leurs recrudescences particulièrement ciblées à des aires géographiques d'exposition laissent supposer que des facteurs environnementaux et/ou des changements de mode de vie peuvent être impliqués dans leurs genèses. Les troubles observés sont d'autant plus préoccupants qu'ils sont évolutifs et persistants.

6. Impact des Xéno-Hormones sur la Fertilité Féminine

Chez la femme, des études récentes retrouvent que la présence urinaire de phtalates, PE de synthèse particulièrement utilisé dans les cosmétiques (Tableau 1 : Principaux PE de synthèse, localisation au quotidien et effets sur l'organisme humain), serait corrélée à une baisse de réserve ovarienne objectivée par un compte folliculaire antral et une AMH moindres [6, 29]. Celle de bisphénol A serait associée à un taux plus élevé de fausses-couches à répétition [30].

La prise de conscience de l'impact des facteurs environnementaux sur la santé reproductive nous a amené à nous interroger sur l'impact du tabac et des pesticides sur la fertilité des couples pris en charge au sein de notre centre, ces deux éléments pouvant représenter des facteurs confondants potentiels.

III. LE TABAC, UN PE QUI AURAIT UN ROLE SUR LA FERTILITE ?

Le tabac est une des substances psycho-actives les plus consommées en France. Près de 14 millions de français sont des fumeurs réguliers, soit 33% des hommes et 21% des femmes en 2000 [31].

En Picardie, ce pourcentage est légèrement supérieur avec 33% des hommes et 30% des femmes chez les 18-75 ans. Dans la population en âge de procréer (15-34 ans), 34.7% des femmes et 46.7% des hommes sont fumeurs. En outre, l'âge de la première cigarette est de plus en plus précoce : un tiers des fumeuses quotidiennes picardes déclare avoir commencer à fumer à 14-15 ans. La part de fumeuses de plus de 10 cigarettes par jour de la tranche 25-34 ans et celle des fumeurs de plus de 10 cigarettes par jour de la tranche 25-29 ans est sensiblement plus élevée qu'au niveau national (16.2% contre 9.7% pour les femmes et 52.4% contre 43.2% pour les hommes)[31].

Le tabac non brûlé contient plus de 25 00 composés chimiques, dont les pesticides appliqués pendant la culture et les nombreux additifs ajoutés au cours du processus de fabrication. Parmi les 4 000 composants de la fumée de cigarettes, au moins une cinquantaine sont reconnus comme carcinogènes. Le tabac est constitué en majeure partie d'hydrates de carbone et de protéines.

Les autres composants significativement représentés sont : des alcaloïdes (0.5 à 5%) dominés par la nicotine, des polyphénols (0.5 à 4.5%), des phytotéroles (0.1 à 0.7%), des alcanes (0.1 à 0.4%), des hydrocarbures polyaromatiques, aldéhydes, amines, nitrates et au moins une trentaine de métaux lourds. Parmi toutes les substances composant le tabac, certaines ont une activité reconnue de perturbateur endocrinien, en particulier le cadmium et l'arsenic.

Le tabac pourrait donc avoir, sur la fertilité des couples, un effet toxique direct mais également un effet toxique indirect via les perturbateurs endocriniens qui le composent.

Le rôle du tabac dans l'infertilité des couples fait l'objet d'études aux résultats parfois contradictoires. Nous présenterons ici l'état des lieux des connaissances concernant l'impact du tabac sur la fertilité au moment où nous nous sommes intéressés à cette problématique.

1. Intoxication tabagique et Délai Nécessaire pour Concevoir (DNC)

Le Délai Nécessaire pour Concevoir (DNC) correspond à la période s'écoulant, chez un couple ayant des rapports sexuels réguliers, entre l'arrêt de toute méthode contraceptive et l'obtention d'une grossesse. En 1996, une première étude européenne multicentrique concernant 4 000 couples rapporte un Odds Ratio (OR) de 1.7 concernant le DNC chez les femmes ayant une consommation de tabac importante [32].

En 1997, une deuxième étude rétrospective menée par Curtis [33] a évalué la probabilité de conception par mois en tenant compte des consommations de tabac mais également de caféine et d'alcool pour chacun des membres du couple. Sur les 1 277 couples qui ont été étudiés (21% de femmes fumeuses et 27% d'hommes fumeurs), un DNC moyen de 3.6 mois était observé avec une diminution de la fécondabilité de 12% chez les fumeuses de plus de 10 cigarettes /jour (homme non fumeur), une diminution de la fécondabilité de 11% chez les fumeurs de plus de 10 cigarettes /jour (femme non fumeuse) et une diminution de la fécondabilité de 28% quand les deux membres du couple consommaient plus de 10 cigarettes/jour. Les autres auteurs rapportent des données assez contradictoires en ce qui concerne l'impact du tabagisme paternel sur le DNC [34, 35, 36].

L'augmentation du DNC chez les couples dont la femme est fumeuse a été confirmée dans plusieurs autres études : Augood en 1998, a réalisé une méta-analyse à partir de 12 études menées entre 1985 et 1997 [37]. Cette méta-analyse portait sur 10 000 couples où la femme fumait (Groupe 1) et 19 000 autres couples où la femme ne fumait pas (Groupe 2). Dans le premier groupe, le DNC était en moyenne augmenté de 6 à 12 mois comparé au deuxième groupe, et ce, parallèlement à la consommation de cigarettes. Cette méta-analyse ne tenait pas compte du statut tabagique du conjoint.

Jensen [38] dans une étude prospective réalisée au Danemark en 1998 s'est intéressé au DNC chez des couples âgés de 20 à 35 ans sans enfant en fonction du statut des femmes vis-à-vis du tabac à l'âge adulte mais aussi de l'intoxication tabagique lors de la vie in utero : la fécondabilité des femmes fumeuses était comparable à celle des femmes non fumeuses exposées in utero (OR= 0.67 versus 0.70). Chez les fumeuses exposées in utero la fécondabilité était fortement diminuée (OR= 0.53).

2. Impact du tabagisme féminin sur la Fertilité

▪ Impact du tabagisme féminin actif sur la fonction ovarienne

Chez la souris Maitilkainen [39], a montré que les hydrocarbures poly-aromatiques (PAH), toxiques chimiques retrouvés lors de la combustion du fuel, et principalement dans la fumée de cigarette, sont responsables d'insuffisance ovarienne précoce. Les PAH agissent via Ahr (Aryl Hydrocarbon receptor), induisant l'expression de Bax dans les ovocytes et leur apoptose. En 2006, Bordel [40] retrouvait, une altération de la croissance folliculaire et une majoration de l'apoptose cellulaire chez les hamsters exposés à la nicotine.

En outre, il a été retrouvé de la cotinine, du cadmium et du peroxyde d'hydrogène, tous des composés de la fumée de tabac, dans les liquides folliculaires de femmes fumeuses. Ces composés semblent être à l'origine de troubles de la méiose responsables d'une altération de l'ovocyte [41]. La concentration de dérivés du tabac du liquide folliculaire augmente de manière proportionnelle avec la quantité de cigarettes fumées. D'autre part, les hydrocarbures également présents dans le tabac peuvent interagir avec le récepteur aryl-hydrocarbure. Ce récepteur nucléaire orphelin lie les hydrocarbures aromatiques polycycliques comme la dioxine, le benzopyrène, les PCB, les nitrofuranes et interfère avec la signalisation oestrogénique.

Chez la femme, dès 1994, Sharara [42] a montré une altération de la réponse ovarienne après administration de 100 mg de clomiphène du 5^{ème} au 9^{ème} jour du cycle chez 65 fumeuses versus 145 non fumeuses. Les dosages de FSH réalisés au 3^{ème} et 10^{ème} jour du cycle montraient que 12.3% des fumeuses versus 4.8% chez les non fumeuses présentaient une altération du taux de FSH alors que les FIV réalisées chez les fumeuses ne montraient pas de modifications des paramètres ovocytaires de fécondation ou de grossesse évolutive. L'auteur concluait à une accélération du processus de vieillissement ovarien.

Des études plus fondamentales ont été réalisées comme celle de Paksy [43] qui a isolé les cellules de la granulosa de 41 femmes bénéficiant de FIV. La mise en culture de ces cellules avec du cadmium, dérivé du tabac, a altéré la communication inter-cellulaire et la production de progestérone.

Zenzen [44] a montré par immuno-marquage que la cotinine pénétrait dans le noyau et le cytoplasme des cellules de la granulosa et ceci de façon plus importante chez les fumeuses actives que passives. De plus il existe une corrélation fortement positive entre le score d'immuno-marquage et le dosage de cotinine dans le liquide folliculaire. Ces résultats ont été confirmés par Gocze [45].

El Nemr [46] dans une étude rétrospective portant sur 173 femmes ayant bénéficié d'une tentative de FIV (108 non fumeuses versus 65 fumeuses) observe chez les fumeuses :

- Une FSH de base significativement supérieure : 7.5 versus 4,7 UI/L ($p < 0.0001$),
- Des doses nécessaires pour la stimulation hormonale significativement augmentées : 48,1 ampoules d'HMG versus 38.9 ampoules ($p < 0.0001$),
- Un taux d'annulation de tentative augmenté du fait d'une réponse ovarienne insuffisante à la stimulation hormonale : 14% versus 5% ($p = 0.1$).

Cependant ces résultats ne sont pas retrouvés dans une étude de plus faible effectif, 19 fumeuses vs 10 non fumeuses, réalisée en 2007 par Neal [47] chez des patientes dont l'âge (34,1 ans vs 33 ans), le taux de FSH de base (5,42 vs 6,18 UI/L $p = 0,03$), et la dose hormonale administrée durant la stimulation étaient comparables. Plus récemment Cooper [36] et Freour [48] ont montré que le tabagisme féminin semble être à l'origine d'une insuffisance ovarienne précoce, les fumeuses présentant un âge de survenue de la ménopause plus précoce que les non fumeuses (47.1 ans contre 49.4 ans) [49].

▪ **Impact du tabagisme féminin sur le développement folliculaire**

Afin de mieux étudier l'impact du benzo-a-pyrene, Neal [47] a cultivé in vitro des complexes folliculaires de rates dans un milieu de culture contenant 1,5ng ml/l de benzo-a-pyrene (concentration similaire à celle observée dans le liquide folliculaire de femmes fumeuses). Il a constaté que la croissance de ces derniers est significativement diminuée par rapport à celle observée dans les follicules non exposés au benzo-a-pyrene (diminution de 30%, $p=0.03$). Les follicules exposés n'ont jamais atteint le stade de follicule antral. Ce qui l'a amené à évoquer une probable toxicité ovarienne du benzo-a-pyrene sur la folliculogénèse.

▪ **Impact du tabagisme féminin sur le nombre d'ovocytes recueillis**

Zenzes [50] a comparé, dans une méta-analyse reprenant les résultats de 9 études, le nombre d'ovocytes recueillis chez des fumeuses versus non fumeuses (soit au total 600 patientes fumeuses versus 1 500 patientes non fumeuses) :

- L'Odd Ratio des ovocytes recueillis entre les 2 groupes est de 0,92 soit une diminution de 8% d'ovocytes recueillis chez les fumeuses.
- Dans 3 de ces 9 études une quantification de la consommation tabagique a été réalisée : la diminution du nombre d'ovocytes recueillis étant majorée de 17% lorsque la consommation était supérieure à 10 cigarettes /jour.

El Nemr [46] a observé un nombre moyen d'ovocytes recueillis chez 65 fumeuses ($6,2$ ovocytes $\pm 3,4$) inférieur à celui obtenu chez 108 non fumeuses ($11,1\pm 6,3$) ($p < 0,0001$). Certains auteurs comme Hughes [51] et plus récemment Neal [47] n'ont pas retrouvé de différence entre fumeuses et non fumeuses. Dans son étude Neal a montré l'absence de différence entre les 2 groupes en ce qui concerne le nombre moyen d'ovocytes recueillis ($11,4$ chez les fumeuses vs $9,6$ chez les non fumeuses).

▪ **Impact du tabagisme féminin sur la maturité ovocytaire**

La maturité ovocytaire semble également perturbée par la consommation de tabac. Zenzes [51] a mis en évidence une relation entre la qualité ovocytaire de 2 020 ovocytes et la consommation tabagique : le pourcentage d'ovocytes matures retrouvés à la ponction était inversement corrélé à la concentration folliculaire en cotinine. Dans son étude Neal [47] a montré l'absence de différence entre les 2 groupes en ce qui concerne le pourcentage d'ovocytes matures ($87,5\%$ vs $78,7\%$).

- **Impact du tabagisme féminin sur la morphologie ovocytaire**

L'analyse in vitro des ovocytes après décoronisation permet de mesurer la zone pellucide. Shiloh [52] a observé une augmentation de l'épaisseur de la zone pellucide chez les fumeuses actives ou passives avec $p < 0,0001$. Cependant l'auteur n'a pas retrouvé de modification dans la capacité naturelle de l'ovocyte à recouvrir une épaisseur de la zone pellucide comparable à celle des non fumeuses 48h après la mise en culture chez les femmes tabagiques actives ou passives.

- **Impact du tabagisme féminin sur les taux de fécondation**

Hughes [51] a montré que le taux de fécondation chez 163 non fumeuses versus 23 fumeuses de plus de 15 cigarettes par jour était significativement supérieur : 79.3% versus 61.3% ($p=0,007$). Zenzes [50] a également retrouvé une augmentation du taux de fécondation parmi les couples où la femme fumait, tout comme Crha [53] (68% vs 48%). Cependant, d'autres auteurs ayant analysé ce paramètre comme Weigert [54] en 1999 et Neal [47] en 2008 ne l'ont pas retrouvée. Zitzmann [55] a rapporté que le tabagisme féminin avait un impact négatif sur le nombre d'ovocytes ponctionnés et fécondés en FIV, mais pas en ICSI.

- **Impact du tabagisme féminin sur le développement embryonnaire**

Hughes [51] a montré que la probabilité de transférer un embryon de bonne qualité chez les fumeuses était diminuée et dépendante de la consommation de tabac (OR= 0,87 fumeuses <15 cigarettes/jour et 0,52 fumeuses ≥ 15 cigarettes/jour), et ce, bien que le taux de clivage embryonnaire ne soit pas influencé par le tabagisme maternel.

Weigert [54] a montré que le score embryonnaire des embryons issus de FIV chez 834 femmes, était diminué chez les fumeuses (43.1 vs 38.9, $p=0,037$). Neal [47] ne retrouve pas ces résultats contrairement à Depa-Martynow [56]. Pour Zenzes [57], la nicotine et la cotinine inhiberaient l'apoptose de certaines lignées cellulaires. L'inhibition de l'apoptose contribuerait à favoriser le développement d'embryons porteurs d'anomalies. Ainsi, l'auteur retrouve une meilleure qualité embryonnaire (Grade I et II), lors de l'analyse morphologique des embryons J2/J3 chez les fumeuses. Ces résultats suggèrent que la consommation de tabac confère aux embryons exposés une certaine résistance à la fragmentation. Le tabac favoriserait alors la survie des embryons (évalués comme étant de « bonne qualité morphologique ») avec pour conséquence le remplacement dans l'utérus maternel d'embryon type I et II mais probablement porteurs d'anomalies génétiques. Ce phénomène pourrait être une des causes des fausses-couches retrouvées chez les fumeuses.

▪ Impact du tabagisme féminin sur les taux d'implantation et de grossesse

Pattinson [58], dans une étude menée sur 124 fumeuses et 236 non fumeuses bénéficiant d'une FIV ne retrouve pas de différence en termes de taux de grossesse, mais une diminution significative du taux d'accouchement chez les patientes fumeuses (9,6% versus 17% avec $p < 0,01$). Crha [53] sur 159 patientes et Depa-Martynow [56] chez 32 non fumeuses vs 27 fumeuses retrouvaient une différence du taux de grossesse entre les fumeuses et les non fumeuses.

Neal [47] a trouvé une différence significative entre les taux d'implantation chez 19 fumeuses versus 10 non fumeuses (25% versus 12% avec $p < 0,05$), de même entre les taux de grossesse de ces deux groupes (40% versus 11% avec $p < 0,05$). Dans cette étude le CES (Score Embryonnaire Cumulé) des cohortes embryonnaires et des embryons transférés était comparable dans les 2 groupes. Les auteurs ont évoqué comme explications de la diminution du taux d'implantation une augmentation d'épaisseur de la zone pellucide qui altérerait l'éclosion embryonnaire nécessaire à une bonne implantation.

Soares [59] dans une étude rétrospective sur la période allant de Janvier 2002 à Juin 2005 portant sur 785 tentatives de dons d'ovocytes a montré que les résultats des tentatives :

- Etaient similaires dans les groupes des donneuses non fumeuses (n=401, 200 grossesses, soit 49,9%) et petites fumeuses (< 10 cigarettes/j) (n=384, 202 grossesses soit 52,6%),
- Qu'il n'existait pas de différence significative entre les receveuses non fumeuses et petites fumeuses notamment en ce qui concerne le taux d'implantation, le taux de grossesse, le nombre de grossesses multiples et de fausses couches par tentative,
- Pour les non fumeuses et les petites fumeuses vs les grosses fumeuses, des résultats significatifs étaient mis en évidence :
 - Le taux de grossesse par tentative était supérieur dans le 1^{er} groupe 52,2 % vs 34,1%,
 - Le taux d'implantation et le nombre de fausses couches étaient comparables dans les 2 groupes,
 - Le taux de grossesses multiples était significativement supérieur dans le groupe des grosses fumeuses (60% versus 31%) avec une augmentation des jumeaux dizygotiques.

▪ Impact du tabagisme féminin sur l'évolution des grossesses

Knoll montre en 1995 que les fumées de cigarettes, primaires et secondaires, provoquent une altération du battement ciliaire des trompes de Fallope de rates observées in vitro diminuant ainsi les chances de conception et de grossesse eutopique [60]. Pattinson [58], a observé un taux de stérilité tubaire supérieur chez les fumeuses (95,5% chez 124 fumeuses vs 80% chez 236 non fumeuses avec $p < 0,001$) et un taux de FCS augmenté chez les fumeuses mais non significatif (42% vs 19%). Ces résultats n'ont pas été retrouvés par Hughes [51].

Dans l'étude de Venners [61], chez les 71 femmes soumises au tabagisme passif (conjoint fumant >20 cigarettes/jour) le nombre de fausses couches précoces est significativement augmenté par rapport aux couples non fumeurs (n=216), (OR=1,81). Bethiller [34] en 2005 retrouve un risque de grossesse ectopique et de FCS supérieur chez les fumeuses. Dans une évaluation de l'impact du tabagisme sur les résultats en FIV, une autre équipe [62] a fait état d'une augmentation des fausses couches du premier trimestre de la grossesse chez les patientes fumeuses versus patientes non fumeuses.

Le tabagisme féminin pourrait altérer la réserve ovarienne et est donc être mis en cause dans la survenue d'Insuffisance Ovarienne Précoce (IOP).

Il est également mis en cause selon les auteurs sur les différents paramètres de l'AMP relatifs à la fonction ovarienne : nombre d'ovocytes recueillis, maturité et morphologie ovocytaire.

Une augmentation des taux de fécondation chez les fumeuses a été spécifiée par certains auteurs, avec cependant une diminution du nombre d'embryons de belle qualité obtenus.

Certains auteurs soulignent les risques de transfert d'embryons d'apparente belle qualité, mais porteurs d'anomalies génétiques, impactant les taux d'implantation.

Si les taux de grossesse semblent être relativement maintenus chez les fumeuses, les taux d'accouchement apparaissent moindres dans certaines études, soulignant le risque majoré de pertes fœtales au premier trimestre de la grossesse.

3. Impact du tabagisme masculin sur la Fertilité

▪ Impact du tabagisme masculin sur les paramètres du sperme

- Sur le volume éjaculé

En 1998, Zavos [63] a comparé le volume éjaculé chez 20 hommes gros fumeurs (plus de 30 cig/j) et 20 non fumeurs. Les volumes moyens observés étaient respectivement de 2,8 ml et 3,1 ml, la différence n'étant pas significative. Ces résultats sont confirmés en 2003 par Kunzle [64] dans une étude de cohorte menée chez 655 fumeurs et 1131 non fumeurs, qui ne retrouvait pas non plus de différence entre les 2 groupes (3,6 vs 3,7 ml) et par Rubes [65].

- Sur la numération spermatique

Zavos [63], tout comme Sepaniak [66] n'observent pas de différence significative concernant ce paramètre qui est diminué dans le groupe fumeur d'autres études. En effet, Rubes [65] retrouve sur 20 fumeurs vs 15 non fumeurs des numérations spermatiques/éjaculat de 65,4 millions vs 143,2 millions ($p < 0,001$). Kunzle [64], dans une étude de cohorte, menée sur un échantillon plus large (655 fumeurs vs 1131 non fumeurs), retrouve une diminution significative du nombre de spermatozoïdes mobiles entre les 2 groupes : 106 vs 127 millions par éjaculat ($p = 0,0016$).

Dans une étude de cas de la littérature [67], les explorations spermatiques chez un homme après trois mois d'arrêt du tabac montraient une amélioration significative de la qualité : 72 millions contre 29 millions de spermatozoïdes par éjaculat, 79% de mobilité contre 33%, 20% de nécropermie contre 60%, et 23 millions de spermatozoïdes sélectionnés par éjaculat contre 3 millions.

- Sur la mobilité spermatique

Zavos [63] sur 20 spermes de gros fumeurs vs 20 spermes de non fumeurs, la mobilité observée était significativement diminuée chez les fumeurs (72% vs 59%). Il montre de plus dans cette étude que si les spermatozoïdes de fumeurs sont transférés dans du plasma séminal d'hommes non fumeurs ou dans du milieu de culture, la mobilité observée durant les 48 heures qui suivent est significativement améliorée. A l'inverse le transfert de spermatozoïdes de non fumeurs dans le plasma séminal de fumeurs affecte leur mobilité.

- Sur la morphologie spermatique

Pour certains il n'a pas été retrouvé d'altération de la morphologie spermatique : Hoidas [68] n'a en particulier pas trouvé d'altérations liées au tabac, de la morphologie spermatique en microscopie électronique. Sepaniak [66] rapporte aussi une absence de perturbation de la morphologie spermatique.

Mais d'autres auteurs retrouvent une tératozoospermie chez les fumeurs : Zavos [69] a observé un effet délétère du tabac sur le flagelle et plus particulièrement au niveau de l'axonème des spermatozoïdes. Mak [70] a mis en évidence une persistance des restants cytoplasmiques chez les fumeurs.

Wong [71] chez 107 hommes fertiles vs 103 n'ayant pas obtenu de grossesse dans leur couple, observe une corrélation significative entre le taux de cotinine dans le plasma séminal et le pourcentage d'anomalies morphologiques ($r=0,19$; $p<0,01$). Kunzle [64], retrouvait 21% de formes typiques chez les fumeurs ($n=655$) vs 24% chez les non fumeurs ($n=1131$), la différence étant significative ($p=0,0007$), cette donnée est confirmée par Kiziler [72] en 2007.

▪ **Tabagisme masculin, Anomalies méiotiques, ADN spermatique et Stress oxydatif**

Les capacités de réparation de la méiose sont diminuées par l'intoxication tabagique [73, 74]. Rubes [65] rapporte une fréquence des aneuploïdies et des disomies augmentée ($p<0,01$) chez les adolescents tabagiques (11 fumeurs 15 non fumeurs), avec une augmentation du risque pour la descendance.

Le tabac semble être à l'origine d'une augmentation du stress oxydatif et a été accusé d'être à l'origine d'altérations de l'ADN nucléaire des gamètes [75, 76]. Saleh [77] a réalisé une quantification du stress oxydatif par chimiluminescence au niveau du plasma séminal chez des hommes infertiles fumeurs et non fumeurs et de donneurs de sperme non fumeurs. La concentration en leucocytes est majorée de 50%, et celle des ROS de plus de 100% chez les fumeurs. Les travaux de Kiziler [72] en 2007 et ceux de Soares [59] en 2008 confirment cette majoration du stress oxydatif.

La fragmentation de l'ADN pourrait être favorisée par l'augmentation du stress oxydatif. L'impact du tabac sur la fragmentation de l'ADN a donc été recherché. Sergerie [78] n'a pas mis en évidence de corrélation entre la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde et la consommation de tabac. Sepaniak [66] quant à lui a montré que le taux de fragmentation est significativement supérieur dans les noyaux des spermatozoïdes des patients fumeurs et semble être un paramètre indépendant des paramètres conventionnels qui peuvent être normaux chez les fumeurs.

En 2007 une étude a été menée par Vilorio [79], portant sur l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique avant et après sélection par swim-up chez 99 hommes (51 non fumeurs vs 48 fumeurs) consultant pour infertilité. Avant sélection, les taux de fragmentation entre les 2 groupes étaient comparables, cependant après swim-up les fumeurs avaient un taux significativement supérieur à celui des non fumeurs ($p=0,028$).

L'analyse de la littérature est discordante quant à l'impact du tabagisme masculin sur les paramètres spermatiques.

Certains auteurs s'accordent à retrouver une diminution de la numération et de la mobilité spermatique, ainsi qu'une augmentation des anomalies morphologiques.

La fragmentation de l'ADN apparaît comme un facteur prédictif négatif des chances de procréer. La survenue de ce phénomène chez les fumeurs pourrait grever les chances d'obtention d'une grossesse.

4. Impact du tabagisme parental sur la descendance

L'impact de l'exposition in utero au tabagisme aurait une influence sur la santé des enfants. En 1999 Jauniaux [80] a montré le passage aisé transplacentaire de la cotinine dans le liquide amniotique, et dans le sang fœtal.

▪ Impact du tabagisme parental sur le sexe-ratio des enfants

L'impact du tabac sur le sexe ratio fait l'objet de résultats contradictoires dans la littérature. Pour Vilorio [81], le tabagisme paternel aurait une répercussion sur le ratio sexuel des embryons au profit des embryons féminins (étude de 144 embryons chez 25 fumeurs vs 191 embryons chez 31 non fumeurs).

Le pourcentage de spermatozoïdes X et Y calculé après FISH sur les spermatozoïdes éjaculés de fumeurs vs non fumeurs ne mettait pas en évidence de variation du sexe ratio. Cependant, lors du diagnostic préimplantatoire pratiqué sur les embryons on observe une augmentation des embryons féminins chez les fumeurs, et celle-ci est indépendante du statut tabagique de la mère. De plus les conjointes non fumeuses de patients gros fumeurs (≥ 20 cigarettes/j) avaient elles aussi un ratio sexuel en faveur des embryons féminins (ratio XY/XX= 10/27 vs 56/40 chez les couples non fumeurs $p=0,0018$). Ceci serait dû à une meilleure sélection des spermatozoïdes X après swim up chez les gros fumeurs comparés aux non fumeurs comme l'a montré l'analyse faite sur les 4 spermatozoïdes de non fumeurs vs 4 spermatozoïdes de gros fumeurs. Après traitement, le ratio Y/X reste inchangé chez les non fumeurs alors qu'il passe de 1,05 à 0,9, la différence étant significative, chez les fumeurs. Cette hypothèse reste à être démontrée sur un échantillon plus large.

- **Impact du tabagisme parental sur les risques de cancers des enfants**

Le risque relatif de cancer dans la descendance des hommes fumeurs est globalement de 1,7 pour tous les types de cancers en comparaison à la descendance d'un père non fumeur. Ce risque semble majoré pour les leucémies aiguës, les lymphomes, et les tumeurs cérébrales (entre 2,7 et 4,5) [56]. L'évaluation du rôle du tabac parental sur le développement de cancers chez leur progéniture s'est d'abord focalisée sur le tabagisme maternel.

Mais le tabagisme paternel, en période péri conceptionnelle, semble corrélé à la survenue de cancers chez l'enfant. Une étude a pu être menée en Chine, où le tabagisme paternel est fréquent et celui maternel rare [82]. L'étude portait sur 642 enfants ayant eu un cancer vs 642 enfants de même sexe, même âge, et même poids à la naissance recrutés dans la population générale n'ayant pas de cancer (population contrôle). Dans le groupe où les enfants avaient un cancer 61% des pères fumaient durant la période périconceptionnelle, contre 59% dans la population contrôle d'enfants non malades (OR=1,3). Le risque relatif de cancer dans la descendance des hommes fumeurs est globalement de 1,7 pour tous les types de cancers comparé à la descendance d'un père non fumeur. De plus ce risque est majoré pour les leucémies aiguës, les lymphomes, et les tumeurs cérébrales (entre 2,7 et 4,5). Ceci serait dû à une augmentation des altérations génétiques prézygotiques, en effet cette corrélation n'est pas retrouvée lorsque les mêmes paramètres sont étudiés chez les enfants dont les pères se sont mis à fumer après leur naissance.

- **Impact du tabagisme sur la fertilité des enfants**

Une diminution de la qualité spermatique chez les enfants de sexe masculin ayant été exposés au tabac in utero a été observée par Jensen [83] en 2005 avec pour conséquences une atteinte des capacités de reproduction de la descendance [84]. Une prévalence augmentée des cryptorchidies [85] a également été mise en évidence. Un impact via le système hormonal fœtal hypothalamo hypophysaire gonadique serait également possible [86] mais ces résultats nécessitent des travaux complémentaires. Côté féminin, le nombre de fausses couches spontanées chez les patientes non fumeuses exposée in utero est augmenté par rapport aux non fumeuses n'ayant pas été exposées in utero (OR=4,35 p=0,04) [87].

- **Autres impacts du tabagisme sur la santé des enfants**

Le poids de naissance des nouveaux nés exposés au tabagisme in utero est connu pour être diminué. Le risque d'enfants morts-nés et de mortalité infantile des enfants exposés au tabagisme in utero est doublé dans certaines études [53]. Enfin, à la naissance, les enfants souffrent plus fréquemment de coliques [88] manifestant peut être ainsi un syndrome de sevrage tabagique.

Les hospitalisations durant les 8 premiers mois de vie sont doublées chez les enfants exposés [54] et les motifs d'hospitalisations sont non seulement pulmonaires mais aussi gastro-intestinaux et dermatologiques. Une augmentation du risque d'allergies semble aussi être observée chez les enfants exposés in utero au tabac. D'autre part, à la naissance, les enfants souffrent plus fréquemment de coliques [89] manifestant peut être ainsi un syndrome de sevrage tabagique et au long terme, le tabagisme in utero majorerait le risque de syndrome hyperactif dans la descendance [90].

5. Impact du tabagisme passif sur la fertilité et l'évolution des grossesses

Neal et al. ont montré que le tabagisme passif diminuait, autant que le tabagisme actif, le taux d'implantation après une FIV, ainsi que le taux de grossesse mais il ne trouvait pas de différence dans le taux de fécondation ou la qualité embryonnaire [90].

Plusieurs études ont montré que le tabagisme, même passif, avait une incidence sur la reproduction [91]. En 2015, il s'est servi du recrutement de l'étude WHI et a pu inclure 77 805 patientes ayant eu au moins une grossesse qui ont complété un questionnaire relatant leur histoire tabagique (jamais fumé, antécédents de tabagisme passif ou actif...) et leur histoire obstétricale (enfant né vivant, fausse-couche, enfant mort-né ou grossesse extra-utérine). Il a montré que le tabagisme passif comme actif, augmente l'incidence des fausses-couches précoces (OR de 1.17 et de 1.16 respectivement), des mort-nés (OR de 1.55 et 1.44) et des grossesses ectopiques (OR de 1.61 et 1.43).

Les études menées jusqu'à ce jour sont sujettes à discussion du fait des différences dans les populations étudiées et des effectifs insuffisants. Il s'agit le plus souvent d'études observationnelles dont les paramètres sont observateurs dépendants.

Toutes ces études ne prennent pas en considération une évaluation exhaustive de l'intoxication tabagique antérieure et une recherche de facteurs confondants comme les pesticides malgré le recrutement rural dans certaines études.

Les professionnels s'accordent cependant à reconnaître un effet délétère du tabac sur la fertilité, soit de manière toxique directe, soit indirecte via les perturbateurs endocriniens présents dans le tabac.

IV. LES PESTICIDES, DES PE QUI AURAIENT UN ROLE SUR LA FERTILITE ?

La France est le quatrième consommateur mondial et premier européen de pesticides (75 000 tonnes par an) [92]. Elle occupe, par la consommation rapportée au nombre d'hectares cultivés, le 3^{ème} rang européen avec 5,4 kg/ha/an [92]. La Surface Agricole Utilisée (SAU) était de 29 millions d'hectares en 2010 soit un peu plus de la moitié de du territoire métropolitain avec des différences importantes selon les départements.

La Picardie, lieu de notre étude, est une région fortement agricole (68% de la SAU soit près de deux fois plus que la moyenne nationale à 34%) et une des plus productives de France. Il s'agit d'une région de grandes cultures à rendements élevés (céréales, oléo-protéagineux, pommes de terre, betteraves et légumes destinés à la transformation...) tandis que l'élevage occupe une place moins importante. Du fait de ces activités agricoles, la Picardie est fortement utilisatrice de Produits Phyto-Sanitaires (PPS). L'utilisation des pesticides y est essentiellement agricole (91% des 4 288 tonnes de pesticides utilisés par an). Celle par les particuliers et jardiniers amateurs ne représente que 8% de cette consommation et les usages professionnels non agricoles 1% [93]. Il est également important de spécifier que l'agriculture biologique couvre seulement 0.7% de la SAU en Picardie contre 4 % de moyenne nationale en 2012. La population se concentre dans de petites communes et seuls 29% des habitants vivent dans des communes de plus de 10 000 habitants contre 48,7% en France métropolitaine ce qui fait d'elle une population majoritairement rurale.

Les pesticides regroupent les produits phytosanitaires, les biocides et les anti-parasitaires à usage humain ou vétérinaire :

- Les produits phytosanitaires (ou phytopharmaceutiques) sont utilisés dans les milieux végétaux agricoles ou non agricoles, pour lutter contre les insectes (insecticides), les mauvaises herbes (herbicides), les champignons et moisissures (fongicides) ou les animaux nuisibles (rodenticides) ;
- Les biocides sont utilisés dans l'industrie (traitement du bois et des textiles), les milieux hospitalier (désinfection) et domestique ;
- Les antiparasitaires luttent contre les parasites humains et vétérinaires (poux, gale, mites, puces, tiques).

Ils sont utilisés principalement en agriculture mais ont également de nombreux autres usages, tels que l'entretien des voiries, des parcs communaux, la lutte contre les insectes indésirables domestiques ou encore la constitution des gels hydro-alcooliques utilisés dans les milieux hospitaliers.

Les pesticides contaminent l'environnement par différentes voies. La contamination de l'air se fait essentiellement par l'usage agricole. Les pesticides s'infiltrant également dans les sols pour s'y fixer plus ou moins durablement. Ils contaminent ensuite les eaux de surface et les eaux souterraines, principales sources d'eau potable. La présence des pesticides dans les eaux de métropole est quasiment généralisée. Les pesticides contaminent ensuite la chaîne alimentaire. L'homme va ainsi être exposé par son alimentation contenant des résidus de pesticides. La contamination humaine peut donc se faire par voie digestive, respiratoire ou cutanéomuqueuse, et il est difficile de connaître la voie les quantités concernées de pesticides ou de métabolites touchant l'être humain.

Les pesticides peuvent être groupés en différentes classes selon leurs compositions chimiques : organophosphorés, organochlorés, carbamates, pyréthrinoïdes et triazines. Le tableau répertorie les principaux pesticides utilisés en fonction de leur composition chimique (*Tableau 2 : Classification des principaux pesticides utilisés en fonction de leur composition chimique*).

Tableau 2 : Classification des principaux pesticides utilisés en fonction de leur composition chimique, source personnelle

Familles	Produits
Organochlorés	Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)
	Lindane
	Endosulfan
	Aldrine, Dieldrine
	Chlordane, Chlordécone
Organophosphorés	Methoxychlore
	Parathion
	Malathion
	Diazinon Glyphosate
Carbamates	Carbaryl
	Carbofurane
	Aminocarbe
Pyréthriodes	Permethrine
	Cypermethrine
	Deltamethrine
Triazines	Atrazine

On répertorie à l'heure actuelle plus de 1 000 substances actives différentes déjà mises sur le marché, certaines ayant fait l'objet de retrait. La liste des 20 pesticides les plus utilisés en Picardie est présentée en annexe 1 (*Annexe 1 : Liste des 20 pesticides les plus utilisés en Picardie*). Un certain nombre de pesticides possèdent une activité avérée ou suspectée de perturbation endocrinienne [94, 95, 96]. Ces produits ont été mis en cause dans les diverses études publiées, notamment épidémiologiques [97]. Ils seraient potentiellement responsables d'anomalies de développement du tractus génital et de l'augmentation de l'incidence des hypospades, mais également de troubles métaboliques, cardiovasculaires et de certains cancers [98].

Le mécanisme d'action évoqué majoritairement est une action de type œstrogénique [5]. Ils imiteraient la fonction de l'œstrogène en agissant, soit comme ligand pour le récepteur, soit en convertissant d'autres stéroïdes en œstrogène actif ou encore en augmentant l'expression des gènes sensibles aux œstrogènes. Il semble que ce soit le cas de certains organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes.

L'effet anti-androgénique a également été rapporté pour le chlore et pour des carbamates, des organophosphorés et des triazines, un groupe d'herbicides inhibant la liaison des androgènes à leurs récepteurs. Les mécanismes sont donc divers mais ils conduiraient majoritairement à une réduction de la capacité des cellules de Leydig à produire des androgènes (y compris ceux mimant les œstrogènes puisqu'ils peuvent se lier aux cellules de Leydig).

L'analyse de la littérature fait état de plusieurs types de publications quant à l'impact des pesticides sur la santé animale ou humaine :

- Des observations de pollutions chimiques dans l'environnement naturel lors d'accidents aiguës ou chroniques,*
- Des expérimentations animales à la recherche de preuves,*
- Des études épidémiologiques à partir des expositions professionnelles*
- Des études cliniques à la recherche d'éléments prouvant la relation cause-effet des pesticides.*

De nombreuses études soit épidémiologiques soit expérimentales ont été publiées ces dernières années mais leur exhaustivité ou leur absence de données exactes d'exposition font qu'elles sont peu comparables voire ininterprétables.

1. Résultats de l'expérimentation animale

L'expérimentation animale a montré l'intérêt des études avec de faibles doses d'exposition [99, 100, 101]. Le débat organisé par le National Toxicology Program (NTP) sous l'égide de l'EPA (Environmental Protection Agency) a montré l'intérêt des études avec une expologie à faible dose au long cours avec des fenêtres d'exposition axées sur les périodes critiques du développement.

L'impact reprotoxique des organochlorés a été montré sur différentes espèces animales : les reptiles [102, 103], les poissons [104], les oiseaux [105] et les mammifères [106, 107]. Mnif en 2007 a fait une revue de la littérature sur les xénobiotiques montrant l'impact reprotoxique des pesticides organochlorés [108].

Plus récemment, Joshi [109] a montré que le chlorpyrifos, pesticide organophosphoré, très utilisé en Picardie et pour la culture du tabac à des doses de 7,5-12,5-17,5 mg/kg/j ne modifie pas significativement le poids du corps des rats, mais entraîne une diminution significative du poids des testicules dans les trois groupes. Akhtar a montré en 2009 [110], que le chlorpyrifos, à la dose de 9 mg/kg-j ne modifie pas le poids des organes vitaux, à l'exception des surrénales dont le poids augmente. Par contre, il observe une diminution du poids des testicules pour ces animaux. Farag, en 2010 a étudié des souris gavées avec du chlorpyrifos pur à 99,2% [111].

La consommation de nourriture est significativement réduite dans le groupe traité avec 25 mg/kg/j entraînant une diminution significative des poids des mâles dans ce groupe. Les poids absolus et relatifs des organes reproducteurs (testicules, épидидymes, queue de l'épididyme, prostate et vésicules séminales) sont réduits de façon spectaculaire dans le groupe traité avec 25 mg/kg/j.

De plus Manikam [112] en 2012 a montré l'existence d'un risque trans-générationnel chez le rat, à la suite d'une exposition in utéro par gavage des femelles gestantes par un mélange de pesticides, avec des troubles de la puberté, des altérations de la spermatogénèse et du développement des follicules ovariens chez les petits rats exposés et jusqu'à la génération F3. De nombreuses publications plus récentes confirment ce risque trans-générationnel chez l'animal.

L'expérimentation animale montre l'existence d'un impact reprotoxique et trans-générationnel après exposition à faibles doses avec dysjonction du lien dose-effet. Cependant, toutes ces études ont utilisé un seul produit et n'ont pas pris en compte le fait que cela ne représente pas la réalité de la contamination humaine qui est secondaire à une exposition multiple.

2. Exposition aux pesticides, DNC et Evolution des grossesses

Actuellement, un nombre croissant d'études s'intéresse aux conséquences du métier d'agriculteur et de l'usage professionnel de produits phytosanitaires sur la santé et la fertilité.

Aux Etats-Unis, une étude de cohorte appelée Agricultural Health Study (AHS) a été conçue pour analyser l'état de santé de 89 655 sujets dont 52 394 exploitants agricoles applicateurs de pesticides et leurs épouses entre 1993 et 2010 [113]. Elle a permis de porter des conclusions sur l'augmentation d'incidence de cancers et autres troubles de santé tels que des maladies neurotoxiques, du système immunitaire, néphrologiques, respiratoires mais aussi de la croissance et du développement de l'enfant en lien avec l'exposition à des pesticides.

Concernant la fertilité, les études se multiplient. On a comparé les éléments de vie reproductive de 957 hommes et 101 femmes exerçant le métier d'agriculteur à ceux de 1 408 témoins et montré que le risque de fausses-couches spontanées était significativement plus important chez les femmes agricultrices avec un Odds Ratio à 4,0 IC 95% (1.14–14.01) [114]. Devant ces conclusions alertantes, diverses études ont cherché à déterminer quel pouvait être l'impact de cet usage professionnel des pesticides sur la fertilité humaine.

Plusieurs études ont cherché à savoir si l'exposition aux pesticides pouvait allonger le délai de conception sans présumer de l'origine masculine ou féminine du défaut. Certaines études ont analysé des couples d'agriculteurs, comme De Cock [115] qui a étudié l'impact sur le délai de conception de l'exposition professionnelle aux pesticides chez des maraîchers aux Pays-Bas en constituant deux groupes de « basse exposition » et de « haute exposition ». Cette étude a montré d'une part que le ratio de fécondabilité diminuait quand l'intensité de l'exposition aux pesticides augmentait.

En effet, les techniques associées à une exposition plus intense, comme par exemple le fait qu'une seule personne réalise tout l'épandage, était associé à un ratio de fécondabilité abaissé à 0.46, IC 95% (0.28-0.77). D'autre part, si la recherche de grossesse débutait dans la période des épandages c'est-à-dire entre mars et novembre, le ratio était encore plus bas à 0.42, IC 95% (0.20-0.92) alors qu'il était à 0.82, IC 95% (0.33-2.02) en dehors de la période d'épandage. Quand on interrogeait les couples, on notait que 28% des couples appartenant au groupe à « haute exposition » avaient dû consulter en AMP contre seulement 8% des groupes à « basse exposition ». Dans cette étude, la part des conséquences sur la fertilité ne peut être faite entre le côté masculin et féminin. Dans les couples d'agriculteurs, fréquemment, l'homme s'occupe du mélange, du chargement et de l'épandage des pesticides alors que la femme s'occupe de l'élagage, de l'éclaircissement et de la récolte des fruits. Les deux subissent une exposition aux pesticides.

L'étude de Sallmen [116] montrait que l'exposition professionnelle de l'homme allongeait le délai de conception, mais ne détaillait pas l'exposition domestique des épouses d'agriculteurs qui pouvait aussi avoir une incidence sur leur fertilité propre. A l'inverse, l'étude de Bretveld [114] comparait le DNC de couples dont la femme ou l'homme étaient agriculteurs à des couples témoins et ne retrouvait pas d'effet de l'exposition professionnelle aux pesticides sur le délai de conception après ajustement sur l'âge maternel, le tabagisme paternel et l'usage de vitamines de grossesse. Cependant, le taux de fausses-couches spontanées avant 20 semaines d'aménorrhée en cas d'exposition maternelle était multiplié par quatre.

Outre l'effet de l'exposition sur le délai de conception, il a aussi été étudié les conséquences des pesticides à usage professionnel sur la grossesse et le fœtus. Certaines études ont montré une incidence de l'exposition professionnelle aux pesticides sur certaines malformations génitales notamment sur l'incidence de la cryptorchidie.

L'étude de Weidner [117] a retrouvé cette anomalie plus fréquemment chez les fils des femmes qui travaillaient dans l'agriculture mais pas chez les enfants d'hommes agriculteurs. L'incidence de l'hypospadias n'était pas différente chez les fils des sujets exposés aux pesticides professionnel. A l'inverse, Nassar retrouvait un risque d'hypospadias multiplié par deux en cas d'exposition professionnelle paternelle à des composés organochlorés [118].

3. Pesticides et Fertilité féminine

Il a été démontré que l'exposition à des pesticides chez des femmes agricultrices augmenterait le délai nécessaire pour concevoir [115]. Lors de l'exposition à des composés organochlorés, dont le DDT, insecticide largement utilisé dans le passé, la même conclusion est observée [20].

En 1999, une étude de fécondabilité des couples d'agriculteurs de l'Ontario a montré que l'exposition féminine à certaines matières actives (glyphosate) ou familles chimiques (organophosphorés) entraînait une augmentation non significative du DNC [119]. En Californie, une étude réalisée chez 289 agricultrices n'a pas montré d'association entre le DNC et la concentration maternelle circulante en DDE ou en DDT [120]. Cependant, le fait d'utiliser des pesticides professionnellement apparaissait significativement associé à une plus faible fécondabilité (OR=0.8, IC 95% : 0.6, 1.0).

L'étude de la cohorte de l'Agricultural Health Study retrouvait un allongement des cycles chez les femmes exposées aux pesticides sans que la distinction soit faite entre l'exposition professionnelle ou domestique [113]. En Colombie, la mesure du DNC chez des femmes travaillant dans le secteur de la floriculture avec usage à la fois d'herbicides, de fongicides, d'insecticides et d'acaricides a rapporté une diminution significative de la fécondabilité [121]. Au Danemark, une étude similaire retrouvait une augmentation du DNC à la limite de la significativité [122].

En ce qui concerne l'âge de la ménopause, plusieurs études concourent à montrer l'avance de l'âge de la sénescence reproductive chez les femmes exposées aux pesticides. Une étude transversale de Grindler a montré que les femmes présentant des taux élevés de β -hexachlorocyclohexane et de mirex avaient un âge moyen plus précoce à la ménopause que les femmes présentant de faibles taux [123]. Au contraire, l'AHS a trouvé chez les femmes exposées un âge de ménopause reculé de 5 mois par rapport aux autres femmes (0.77, IC 95%: 0.65, 0.92).

Harley a étudié 289 femmes et montré que l'emploi de pesticides dans un cadre domestique et le fait de résider à proximité d'un champ cultivé apparaissaient significativement associés à une plus faible fécondabilité [120].

En Bretagne, une étude chez 394 femmes enceintes de la cohorte Pelagie [124] a cherché à mesurer l'effet sur la fertilité de l'ingestion de biphényles polychlorés (PCB) et de pesticides organochlorés retrouvés dans les poissons et fruits de mer. Chevrier a pu mettre en évidence une augmentation du DNC chez les consommatrices de fruits de mer mais pas de poisson. Il a également dosé ces pesticides dans le sang de cordon lors de l'accouchement et a retrouvé une association entre des dosages supérieurs de pesticides (DDE) dans le sang de cordon et un DNC allongé.

Diverses autres études s'entendent sur un lien possible entre l'exposition aux PPS et l'augmentation des cas de syndrome de ovaires polykystiques et d'endométriose qui s'associent à des difficultés de procréation.

Les résultats des différentes études convergent assez clairement vers un impact de l'utilisation des pesticides, en particulier dans un cadre professionnel, sur les capacités de reproduction féminine. Ces études sont centrées sur l'étude d'un agent toxique précis et ne prennent pas en compte une exposition multiple.

4. Pesticides et Fertilité masculine

Un des premiers cas de prise de conscience de l'effet de l'exposition à des pesticides sur la fertilité provient de l'usage à grande échelle du dibromochloropropane ou DBCP, un nématocide qui était utilisé sur des cultures tropicales. Une « épidémie d'infertilité » chez les ouvriers des usines de production du DBCP et chez les cultivateurs l'utilisant dans les exploitations agricoles a conduit à des explorations spermatiques et sanguines qui ont permis de détecter des cas multiples d'oligozoospermie voire d'azoospermie associés à une élévation des taux plasmatiques des gonadotrophines. Les études sur le rat sont venues confirmer l'effet de ce pesticide au niveau des spermatogonies et également son irréversibilité [125, 126].

En 2015, une étude in vitro sur un modèle humain constitué à partir de cellules souches pluripotentes orientées sur la spermatogénèse a montré que l'exposition au DBCP induisait une apoptose cellulaire, un taux de spermatides haploïdes diminué et la formation de ROS (Reactive Oxygen Species) responsables d'un stress oxydatif délétère à la cellule germinale [127]. L'effet endocrinien est encore mal compris. Ce pesticide a été interdit d'usage à partir de 1979 aux Etats-Unis.

Un autre insecticide nommé carbaryl a été incriminé. Une étude observationnelle avait détecté une élévation significative des anomalies morphologiques des spermatozoïdes chez les employés d'une plantation utilisant le carbaryl. Les travailleurs embauchés depuis plus d'un an avaient 50.0% de tératozoospermie en comparaison de ceux recrutés depuis moins d'une année qui étaient à 41.9% d'anomalies de la morphologie spermatique ($p < 0.05$). Il n'y avait pas de différence concernant la numération de spermatozoïdes. L'analyse de sujets ayant eu une exposition passée ancienne au carbaryl semblait montrer l'irréversibilité de ses effets sur la morphologie spermatique [128].

Lerda a comparé les paramètres spermatiques de deux groupes d'hommes, l'un exposé à l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, l'autre témoin non exposé. Le groupe exposé montrait un pourcentage supérieur d'asthénospermie, de nécrospermie et de tératospermie. Il n'y avait pas de différence de volume spermatique [129].

Dans son étude, Lifeng montre une baisse de la numération totale et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs chez les employés exposés au fenvalérate par rapport aux témoins administratifs, par contre il ne met pas en évidence de différence de morphologie ou de concentration en spermatozoïdes par millilitre, de volume et de pH séminal [130].

Padungtod a évalué le sperme de travailleurs utilisant l'éthylparathion, un pesticide organophosphoré. Il a retrouvé une réduction significative de la concentration et de la mobilité spermatique mais pas du pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale [131]. Il a également montré un risque significativement supérieur d'aneuploïdies (disomie du chromosome 18 et des gonosomes) parmi les exposés [132].

Xia a obtenu une conclusion similaire dans son étude sur la génotoxicité du carbaryl. Il a montré que le pourcentage de disomies sur le chromosome sexuel et sur le chromosome 18 était significativement supérieur dans le groupe exposé [133].

Enfin, une autre étude a classé des hommes exposés aux pesticides organophosphorés en 3 groupes selon le dosage urinaire obtenu et contrôlé leurs paramètres spermatiques. Il y avait une différence significative sur le volume et la numération totale spermatique entre le groupe le moins exposé et le plus exposé mais pas sur la concentration, la mobilité, la viabilité ou le taux de formes vivantes [134].

Bian a également cherché à évaluer l'effet des pesticides sur l'ADN spermatique entre deux groupes d'hommes, l'un exposé au fenvalérate et l'autre non exposé. Il a pu montrer un taux d'altération de l'ADN spermatique significativement supérieur chez les hommes exposés [135], comme l'avait conclu Xia pour l'exposition au carbaryl [133].

Concernant la fertilité masculine, il semble donc que l'effet de chaque pesticide sur les paramètres spermatiques soit assez spécifique, celui-ci ne pouvant pas être occulté.

V. PRISE DE CONSCIENCE DE LA COLLECTIVITE, MESURES ET REGLEMENTATIONS

Les PE sont désormais considérés comme un véritable problème de santé publique en France et en Europe. Au niveau européen est entré en vigueur un règlement intitulé REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals) en 2007. Son rôle est de protéger la santé humaine contre les risques liés aux substances chimiques, afin de sécuriser la fabrication et l'utilisation des substances chimiques dans l'industrie européenne, en obligeant par exemple les industriels à fournir des fiches précises de données de sécurité pour toute substance chimique utilisée en Europe.

Le gouvernement français a instauré en 2005 le PNRPE (Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens) dont les objectifs sont de soutenir la recherche concernant les PE et leur devenir dans l'environnement, de favoriser la compréhension de leurs effets et d'identifier leurs dangers pour la santé.

Lors de la conférence environnementale de septembre 2012, la France s'est engagée à définir une stratégie nationale sur les PE. Sa mise en œuvre constitue l'une des actions phares du 3^{ème} Plan National Santé Environnement (PNSE 3, 2015-2019). Celui-ci vise à renforcer la recherche, la surveillance et la réglementation afin de prévenir et de limiter l'exposition de la population aux substances à risques, en particulier envers les populations les plus vulnérables: les enfants et les femmes enceintes. C'est ainsi que l'Agence Nationale de Santé Publique (ANSP) a été chargée d'évaluer l'évolution de la fertilité en France (fréquence des malformations congénitales, cancer du testicule, qualité du sperme, bilan de la fertilité des couples).

Les études tentant de mettre en évidence un lien causal entre l'exposition aux PE et les troubles de la fertilité humaine sont de plus en plus nombreuses et ont conduit à une prise de conscience collective de ces problématiques. L'impact des perturbateurs endocriniens, en particulier du tabac et des pesticides sur la fertilité, est désormais un enjeu de santé publique.

Divers obstacles rendent difficile à démontrer un lien de cause à effet certain entre l'exposition aux PE et une baisse de fertilité : long délai d'action, effet de bioaccumulation, exposition difficile à quantifier, expositions faibles à tous les stades de la vie, expositions multiples concomitantes à différents types de perturbateurs endocriniens. Leur étude est complexe et les conclusions des travaux sont parfois contradictoires.

*Dans ce contexte, le choix de la thématique « Reproduction et Environnement » a déterminé la réalisation de différents travaux dont les résultats seront présentés dans le cadre de cette Thèse de Science sous le titre « *Impact des facteurs environnementaux sur la fertilité : Rôles du tabac et des pesticides* ».*

Ces travaux ont été menés au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie du CHU d'Amiens, en collaboration avec l'équipe PERITOX, PERInatalité et risques TOXiques (unité INERIS EA 4285-UMI 01) de l'Université Jules Verne d'Amiens, le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU d'Amiens et le service de Pharmacologie du CHU d'Amiens.

DEUXIEME PARTIE

PRESENTATION DES TRAVAUX REALISES

ET DES RESULTATS OBTENUS

Dans cette partie de présentation des différents travaux réalisés et des résultats obtenus, chaque étude donnera lieu à une présentation succincte sous la forme d'une fiche synthétique « Résumé », suivie de sa version complète.

Pour les travaux publiés ou soumis avec présentation du draft, les références bibliographiques se trouvent à la fin de l'article en question.

Pour les autres travaux, les références bibliographiques sont colligées dans la bibliographie générale de la thèse.

Nous présenterons tout d'abord les études observationnelles menées au sein de notre centre qui nous ont conduit à nous intéresser à la question de l'impact du tabac et des pesticides sur la fertilité des couples.

1. Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « *Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives* »,

Etude réalisée dans le cadre de la validation de mon Mémoire de DESC de Médecine de la Reproduction en 2009

2. Présentation de l'article intitulé « *Impact of oocytes with CLCG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure* »,

Article publié dans « Journal of Ovarian Research. 2017 ;10 :42 ».

3. Présentation de l'article intitulé « *Qualité ovocytaire en FIV et exposition aux pesticides* »,

Article accepté dans « Médecine de la Reproduction », en cours de corrections en octobre 2018.

4. Présentation de l'article intitulé « *Endocrine disruptors and a potential decline in fertility : a case-control study in the Picardy region of northern France* »,

Article soumis au « Journal Environmental health and preventive médecine » en octobre 2018

Devant les résultats de ces différentes études observationnelles, nous avons ensuite souhaité étudier l'exposition au tabac par le biais de la mise au point de la recherche de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes prises en charge en FIV+/-ICSI au sein de notre centre.

5. Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « Résultats des analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes prises en charge en FIV+/- ICSI en fonction de leur statut tabagique »,

Etude réalisée dans le cadre de la validation de mon Mémoire de Master 2 en 2010

Ces résultats ont été à l'origine de la mise en place d'un PHRC (Programme Hospitalier de Recherche Clinique), sur la thématique « Reproduction et Environnement », intitulé « TABAFERTIMASC » pour impact du TABAgisme sur la FERTilité MASCuline. Nous présenterons donc ensuite la méthodologie établie dans le cadre de ce PHRC ainsi que les résultats déjà obtenus.

6. Présentation de la Méthodologie établie dans le cadre du PHRC « TABAFERTIMASC »

7. Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse des questionnaires d'exposition toxique du PHRC « TABAFERTIMASC »

« Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles »,

Article en cours de traduction pour soumission en anglais

8. Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse des données du PHRC

« Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité féminine »,

Article en cours de rédaction

Devant les différents résultats obtenus, nous avons réalisé une plaquette d'informations à destination des couples en âge de procréer afin de mettre à disposition un outil de prévention primaire

9. Réalisation d'une plaquette d'informations à destination des couples en âge de procréer sur la thématique

« Perturbateurs Endocriniens, Attention à ma Fertilité »

Nous avons également voulu étudier, sur un versant plus expérimental, l'impact d'une intoxication chronique au chlorpyrifos (insecticide dont l'utilisation est largement répandue dans le milieu agricole et, en particulier, dans la culture du tabac) sur les organes génitaux de rats après exposition anté, per et post-natale.

10. Présentation de l'article intitulé « *Impact of prenatal and postnatal exposure to Chlorpyrifos (CPF) on the Wistar rat's offspring* »,

Article en cours de relecture pour soumission en anglais

1. **Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives »**,

Etude réalisée dans le cadre de la validation de mon mémoire de DESC de Médecine de la Reproduction en 2009

Introduction – Objectifs

Le tabagisme chez les couples en âge de procréer est en constante augmentation. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les résultats obtenus en termes de taux de grossesse après Fécondation In Vitro avec ICSI en fonction du statut tabagique des deux membres du couple. Les objectifs secondaires de cette étude étaient l'évaluation de l'impact du tabac sur les autres paramètres relatifs à l'AMP.

Matériel et Méthode

Nous avons mené une étude rétrospective monocentrique sur les tentatives de FIV avec ICSI menée en 2007 chez les patientes de moins de 35 ans au sein de notre service, en distinguant 4 groupes en fonction du statut tabagique de chacun des membres du couple (G1 : Couples non fumeurs, G2 : Hommes fumeurs, G3 : Femmes fumeuses, G4 : Couples fumeurs).

Résultats

Un total de 110 tentatives a pu être analysé. Nous avons pu retenir un recours à l'AMP plus tardif chez les couples dont les deux membres sont fumeurs, une absence d'altération de la réserve ovarienne, une diminution des taux de fécondation en cas de tabagisme masculin, une altération de la qualité du développement embryonnaire précoce avec diminution du nombre d'embryons de type A dans la classification des BLEFCO quand la femme est fumeuse, une absence de différence significative concernant les taux de grossesse clinique par ponction et par transfert.

Discussion

Cette étude n'a pas permis de retrouver l'altération de la réserve ovarienne comme décrite classiquement chez les fumeuses [42, 46]. En cas de tabagisme masculin, nous avons confirmé, même face à de faibles effectifs, une diminution des taux de fécondation [51]. Chez les fumeuses, l'impact du tabac sur la qualité embryonnaire a été confirmée, sans retentissement sur les taux de grossesse.

Conclusion

Cette étude préliminaire nous a permis d'identifier, sur de faibles effectifs, un impact du tabagisme sur des éléments clés de la prise en charge en FIV.

Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « *Impact du tabagisme sur les paramètres de l'AMP, analyse de 110 tentatives* »,

Etude réalisée dans le cadre de la validation de mon mémoire de DESC de Médecine de la Reproduction en 2009

Nous avons mené une étude rétrospective monocentrique préliminaire en 2007 au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CECOS de Picardie et Cytogénétique du CHU d'Amiens. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les résultats obtenus en termes de taux de grossesse après Fécondation In Vitro avec ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) en fonction du statut tabagique des deux membres du couple. Les objectifs secondaires de cette étude étaient l'évaluation de l'impact du tabac sur les autres paramètres relatifs à l'AMP.

Cette étude concernait les tentatives de FIV avec ICSI avec ponction ovocytaire menées au cours de l'année 2007 chez les couples dont la femme était âgée de moins de 35 ans le jour de la ponction soit un total de 110 tentatives.

Il avait été volontairement choisi d'étudier le sous-groupe de couples ayant bénéficié d'une FIV avec ICSI car cette technique permet d'évaluer la maturation ovocytaire le jour de la ponction. Il avait d'autre part été choisi de retenir les couples dont la femme était âgée de moins de 35 ans le jour de la ponction afin de limiter les effets de l'âge sur la réponse ovarienne. Les critères d'exclusion suivants avaient été définis : couples bénéficiant d'un don de gamètes (don d'ovocytes ou don de sperme) et couples bénéficiant d'un transfert embryonnaire aux stades deux pronucléïs ou blastocyste.

En fonction du statut tabagique de chaque membre du couple, il avait été défini les quatre sous-groupes suivants :

- ❑ Groupe 1 (**G1**) : Tentatives menées chez **couples non fumeurs**
- ❑ Groupe 2 (**G2**) : Tentatives menées chez les couples avec **hommes fumeurs**
- ❑ Groupe 3 (**G3**) : Tentatives menées chez les couples avec **femmes fumeuses**
- ❑ Groupe 4 (**G4**) : Tentatives menées chez **couples fumeurs**

Les éléments suivants ont été analysés : Paramètres de la stimulation ovarienne, nombre et qualité des ovocytes recueillis, taux de fécondation, nombre et qualité des embryons obtenus à J2 ou J3 et taux de grossesses.

▪ **Caractéristiques de la population étudiée en fonction de leur statut tabagique**

Les éléments relatifs aux caractéristiques des couples en fonction de leur statut tabagique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Caractéristiques des couples en fonction de leur statut tabagique

(# : $p < 0,02$, ## : $p < 0,05$)

	G 1	G 2	G 3	G 4
Nombre de tentatives	54	15	10	31
Age moyen de la femme (années)	29 ± 2	28,5 ± 3	29 ± 3	28 ± 3
Durée moyenne d'infertilité (années)	3,6 ± 1,7 [#]	4,2 ± 2,1	4,8 ± 2	4,6 ± 2,4 [#]
Taux de FSH basal (UI/L)	6,8 ± 2	7,3 ± 1,2 ^{##}	6,15 ± 1,4 ^{##}	7,1 ± 2
Taux moyen d'oestradiol au déclenchement (pg/ml)	2414	2785	2158	2235

Nous avons pu d'emblée remarquer qu'il n'apparaissait pas de différence significative entre les différents groupes concernant le paramètre « âge de la femme ». Une différence significative de la durée d'infertilité est observée entre les couples non fumeurs et les couples fumeurs ($p < 0,02$). La durée d'infertilité est significativement inférieure chez les couples non fumeurs comparée à celle des fumeurs (3,6±1,7 versus 4,6±2,4 ans), alors qu'il n'est pas observé de différence significative d'âge entre les femmes de ces 2 groupes, élément en faveur d'un recours à l'AMP plus tardif quand les couples sont fumeurs.

Le taux de FSH basal est significativement plus bas dans le groupe des femmes fumeuses (G3) comparé à celui du groupe où les femmes ne fument pas (G2) (7,3±1,2 versus 6,15±1,4 UI/L, $p < 0,05$). Ce paramètre n'est cependant pas significatif dans la comparaison du groupe où les deux membres du couple sont fumeurs (G4) par rapport aux groupes où la femme ne fume pas (G1 et G2), ce qui en limite la significativité.

Il n'est pas observé de différence significative entre les différents groupes en ce qui concerne le taux d'estradiol au déclenchement, en particulier en comparant les groupes G2 et G3 pour lesquelles il était apparu une différence significative concernant le paramètre taux de FSH basal.

▪ **Caractéristiques des paramètres de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples :**

Les éléments relatifs aux paramètres de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Caractéristiques des paramètres de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples (# : $p < 0,02$, ## : $p < 0,05$)

	G 1	G 2	G 3	G 4
Nombre de tentatives	54	15	10	31
Nombre total d'ovocytes ponctionnés	675	145	114	348
Nombre moyen d'ovocytes ponctionnés	12,5	9,7	11,4	11,2
Nombre total d'ovocytes matures	465	92	74	240
Nombre moyen d'ovocytes matures	8,6	6,13	7,4	7,7
Pourcentage d'ovocytes matures	70	63	66	69
Nombre d'ovocytes vus fécondés	275	50	47	120
Taux de fécondation (en %)	59 ^{##}	54	64 ^{##}	50 ^{##}
Nombre total d'embryons obtenus à J2	291	51	49	133
Pourcentage d'embryons de type A (BLEFCO)	57 ^{#,##}	49	36 [#]	46 ^{##}

Aucune différence significative n'apparaît concernant les critères de nombre total d'ovocytes ponctionnés, nombre total d'ovocytes matures et pourcentage d'ovocytes matures dans notre étude.

Les taux de fécondation des tentatives réalisées chez les couples non fumeurs est significativement supérieur à ceux des couples fumeurs ($p < 0,05$). Nous pouvons remarquer que lorsque seule la femme fume (G3), le taux de fécondation moyen reste significativement supérieur à celui des couples fumeurs ($p < 0,05$). D'après ces éléments, les taux de fécondation sont donc significativement supérieurs chez les couples où l'homme ne fume pas et ce paramètre apparaît donc essentiellement lié au tabagisme masculin.

Le pourcentage d'embryons de type A dans la classification des BLEFCO est significativement supérieur dans le groupe des couples non fumeurs (G1) comparé à celui du groupe où seule la femme fume (G3) ($p < 0,02$) et à celui où les 2 membres du couple fument (G4) ($p < 0,05$). Le pourcentage d'embryons de type A dans la classification des BLEFCO chez les fumeuses, que leur conjoint soit ou non fumeur, est significativement inférieur à celui des non fumeuses.

▪ **Résultats de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples**

Les résultats de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Résultats de l'AMP en fonction du statut tabagique des couples

	G1	G2	G3	G4
Nombre de tentatives	54	15	10	31
Nombre de transferts	51	12	8	25
Nombre de grossesses cliniques	14	5	2	7
Taux de grossesse cliniques par ponction	26	33	20	23
Taux de grossesse cliniques par transfert	27	42	25	28

Il n'a pas été observé de différence significative en ce qui concerne les taux de grossesse clinique par ponction et par transfert.

Éléments à retenir de cette étude préliminaire (Analyse de 110 tentatives) :

- *Recours à l'AMP plus tardif chez les couples dont les deux membres sont fumeurs*
- *Absence d'altération de la réserve ovarienne comme décrite classiquement chez les fumeuses*
- *Diminution des taux de fécondation en cas de tabagisme masculin*
- *Altération de la qualité du développement embryonnaire précoce avec diminution du nombre d'embryons de type A dans la classification des BLEFCO quand la femme est fumeuse*
- *Pas de différence significative concernant les taux de grossesse clinique par ponction et par transfert*

2. **Présentation de l'article intitulé « *Impact of oocytes with CLCG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure* ».**

Article publié dans Journal of ovarian research. 2017 ;10 :42.

Introduction – Objectifs

Il peut parfois être observé, après décoronisation ovocytaire, des granulations centrales plus denses que le cytoplasme adjacent définissant les « ovocytes à cytoplasme granuleux ». L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'impact de ces « ovocytes à cytoplasme granuleux » sur les résultats observés en FIV/ICSI. L'objectif secondaire de ce travail est de corrélérer l'observation de ces ovocytes granuleux à un niveau d'exposition toxique aux pesticides en fonction du lieu d'habitation des femmes.

Matériel et Méthode

Les ovocytes issus des tentatives de FIV/ICSI menées entre 2009 et 2011 chez des patientes de moins de 35 ans pour lesquelles au moins 5 ovocytes ont été recueillis à la ponction ovocytaire ont été observés selon les critères sus-cités.

Un premier groupe de patientes (Groupe 1) a été défini quand moins de 25% des ovocytes présentaient une zone centrale de cytoplasme granuleux, le Groupe 2 correspondant aux patientes pour lesquelles au moins 75% des ovocytes présentaient une zone centrale de cytoplasme granuleux. Les différents paramètres de l'AMP ont été analysés entre ces deux groupes de patientes.

L'exposition aux pesticides via le lieu d'habitation a été évaluée par l'intermédiaire de la quantité de substances actives retrouvées dans les masses d'eau superficielles en 2009, exprimée en g/hectare de surface agricole utile. Une carte communale de la région Picardie a été établie par le Groupe Régional des Etudes Phyto-sanitaires de Picardie (GREPP), établissant 5 zones de niveaux d'exposition différents.

Résultats

Sur les 633 tentatives de FIV/ICSI réalisées au sein de notre centre sur cette période, 83 correspondaient aux critères du Groupe 1 et 68 à ceux du groupe 2. Les paramètres démographiques et étiologiques des couples pris en charge sont comparables entre les deux groupes (âges, intoxication tabagique, durée et type d'infertilité, réserve ovarienne et caractéristiques du sperme).

L'analyse des résultats des tentatives retrouve :

- Une différence significative des taux de fécondation (66.5% dans le groupe 1 vs 49.1 pour le groupe 2, $p < 0.05$), alors que le nombre moyen d'ovocytes recueillis et d'ovocytes matures ne sont pas différents statistiquement entre les deux groupes.
- Une différence significative des taux de grossesse évolutive et d'accouchement par transfert (respectivement 31.6 et 30.3% dans le groupe 1 versus 14.5 et 12.7% dans le groupe 2, $p < 0.01$), alors que le nombre d'embryons transférés et le taux de grossesse clinique par transfert ne sont pas différents statistiquement entre les deux groupes.
- Une différence significative du nombre d'embryons obtenus : 7.1 +/- 4.3 dans le groupe 1 vs 4.9 +/- 3.6 dans le groupe 2, $p < 0.001$, associé à une différence significative du nombre d'embryons congelés : 1.8 +/- 0.5 dans le groupe 1 vs 1.2 +/- 0.7 dans le groupe 2, $p < 0.0001$.
- Après analyse multivariée, l'odds ratio de survenue des fausses-couches spontanées du 1^{er} trimestre de la grossesse chez les femmes avec plus de 75% d'ovocytes avec une zone centrale de cytoplasme granuleux (groupe 2) est de 3.1 avec un IC 95% : [2.1-4.1] ($p < 0.01$).
- L'analyse de l'exposition professionnelle a révélé l'absence d'impact du métier sur la survenue d'une cohorte d'ovocytes avec une zone centrale de cytoplasme granuleux (12 versus 17.6% de métiers jugés à risque respectivement dans le groupe 1 et 2 ; $p > 0.05$).
- Nous avons observé une différence significative lorsque l'on considère le lieu d'habitation des couples corrélé aux zones d'utilisation des pesticides dans la région Picardie : globalement 27.8 % des couples du groupe 1 résident dans des zones géographiques hautement exposées aux pesticides (zones 3, 4 et 5) contre 66,2% des couples du groupe 2 ($\chi^2 : 22.46 ; p < 0.00001$).

Conclusion

Ce travail confirme le caractère péjoratif de l'observation d'ovocytes présentant une zone centrale de cytoplasme granuleux, en particulier sur l'évolutivité des grossesses. L'exposition aux pesticides est un des critères évoqués et est en cours d'étude au sein de notre centre.

RESEARCH

Open Access



Impact of oocytes with CLCG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure

Philippe Merviel¹, Rosalie Cabry^{2,3}, Karen Chardon³, Elodie Haraux³, Florence Scheffler^{2,3}, Naima-belhadri Mansouri², Aviva Devaux^{2,3}, Hikmat Chahine⁴, Véronique Bach³, Henri Copin² and Moncef Benkhalifa^{2,3*}

Abstract

Background: Oocyte quality is a key limiting factor in female fertility which is primarily reflected in morphological features. Centrally located cytoplasm granulation (CLCG) is one type of cytoplasmic dimorphism exhibited by oocytes that could be linked to pesticide exposure with a significant risk of decreased ICSI outcomes.

Methods: This retrospective study included 633 women who were part of an intracytoplasmic spermatozoa injection (ICSI) program between 2009 and 2011. The participants lived in the Picardy region of France and had been exposed to pesticides. The participants were divided in two groups based on prevalence of oocytes with CLCG (LCLCG [$n = 83$]: low prevalence of oocytes with CLCG under 25%. HCLCG [$n = 68$]: high prevalence of CLCG over 75%). The embryological and clinical outcomes were analysed for both groups and were calculated using the difference between the two values.

Results: Results for couples with HCLCG compared to LCLCG showed a decrease in embryo cleavage, ongoing pregnancy, and live birth rates (82%, 14%, 13% vs 99%, 32%, 30%, respectively). The early miscarriage rate was increased (47% vs 11%), with an OR of 3.1 (95%CI [2.1–4.1]). Due to high pesticide exposure (over 3000 g/ha), there is a higher risk of a resulting disturbed oocyte cohort with a high prevalence of CLCG over 75%.

Conclusion: The high prevalence of oocytes with CLCG over 75% has a negative effect on embryos and the general ICSI clinical outcomes. Furthermore, a putative association between pesticide exposure and risk of CLCG was identified, justifying the need for further research and a potential need to find alternative assisted reproductive technologies for these couples.

Trial registration: Tabacfertimasc. ID number: ID2011-A00634–37; registered 2011/2/8

Keywords: Ovarian stimulation, Oocyte morphology, Dysmorphic cytoplasm, Pesticide exposure, ICSI outcomes

Background

The assessment of oocyte quality using an inverted microscope is mainly based on cytological and morphological criteria. However, this evaluation does not fully reflect the level of oocyte maturation competency, fecundability, or its ability to support early embryonic development. It is commonly accepted that a “good quality” oocyte at

metaphase II (MII) stage presents a moderately granular vacuole-free cytoplasm, a thin perivitelline space, a non-fragmented round polar body, and a round, homogeneous, non-dense zona pellucida [1–3]. However, it has been reported that more than 50% of collected oocytes after controlled ovarian stimulation (COS) present one or more anomalies [4, 5], and generally 93% of patients undergoing assisted reproductive technologies (ART) have at least one abnormal oocyte [6]. Oocyte dysmorphism could be exhibited as the presence of an abnormally granular cytoplasm, vacuoles, refractile bodies, a wide perivitelline space, an abnormal zona pellucida, aggregations in the endoplasmic reticulum, or other anomalies [7]. Among

* Correspondence: benkhalifamoncef78@gmail.com

²ART and Reproductive Biology laboratory, University hospital and school of medicine, Picardie University Jules Verne, CHU Sud, 80054 Amiens, France

³PERITOX-INERIS laboratory, CURS, Picardie University Jules Verne, CHU Sud, 80054 Amiens, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

these abnormalities, cytoplasmic granularity most commonly affects embryo development [6, 8–10].

Centrally located cytoplasmic granulation (CLCG) was first defined by Serhal et al. [8] as “clearly delimited central granulations that are denser than the adjacent cytoplasm”. Some authors suggest that there is a relationship between CLCG and smooth endoplasmic reticulum clusters (sERC) [11] or aggregates of tubular smooth endoplasmic reticulum (aSERT) [12] with mitochondrial disturbance. Furthermore, Otsuki [13] observed that numerous small refractile (lipofuscin) bodies were located within the CLCG, suggesting that these abnormalities may have a common origin. The biomolecular explanation for this phenomenon is still enigmatic. However, the most plausible hypothesis that could explain CLCG dysmorphism is cytoplasmic immaturity [14, 15] which would be responsible for embryonic aneuploidy production at 52–57% [14, 16] and having 50% of risk to occur it in early meiotic maturation [17, 18]. Moreover, the most affected oocytes by toxic environment exposure are those at the pre-meiotic maturation stage [14, 16].

Despite the lack of clear explanation involving the real mechanism of CLCG production in oocytes, the impact on ART outcomes cannot be ignored. As already reported by Serhal et al. [8], the exhibited CLCG by oocytes declined implantation rate from 10% to just 1% without any ongoing pregnancy. Rienzi et al. [6] could evaluate therefore the oocyte morphology and conclude that CLCG affects pronuclear morphology (OR: 2,65 [1,45–4,85]) and embryo quality (OR: 2,26 [1,25–4,08]) confirmed by several studies [9, 19–21]. Kahraman et al. [14] showed that oocyte CLCG results in 28% of clinical pregnancy with high miscarriage rate of 54% confirming Alikani et al. [22] results. In fact, this negative impact on ART outcomes is evident result of an increased embryonic aneuploidy production risk issued from oocytes with CLCG [14, 16, 23].

However, there are discrepancies in results as reported by Rienzi et al. [3] which could be explained by the presence of intra-individual variation in the percentage of oocytes displaying CLCG in participants of the ICSI program. Nevertheless, Kahraman et al. [14] focused on CLCG phenotype involving its correlation with variables between different couples, either intrinsically or extrinsically linked to environmental conditions. Indeed, oocyte maturation and follicle physiology have been shown to be impaired by persistent environmental pollutants [24]. This issue calls into question the adverse effects of pesticide exposure on oocyte quality, i.e. CLCG prevalence and its developmental ability impacting eventually ART outcomes.

Our ART center is located in Picardy (northern France), a region well known for its high annual pesticide consumption of about 3900 tons used in the agricultural sector. Pesticides and their degradation products can contaminate water, soil, and air; therefore humans can be exposed to these compounds. Moreover, endocrine

disruptor chemicals derived from certain pesticides (2,2-Bis [p-hydroxyphenyl]-1,1,1-trichloroethane [HPTE]; antiandrogenic endocrine disruptors; high concentration of total bisphenol A [BPA]; diethylstilbestrol [DES]; methoxychlor [MXC]; polychlorinated biphenyl [PCB] congeners, p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane [DDT], and its persistent metabolite p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene [DDE]) are among the factors that are incriminated for having an adverse impact on several aspects of ovarian biology including oocyte quality [25, 26].

The aim of the present study was to investigate the ICSI outcomes of couples presenting different CLCG prevalence's of retrieved oocytes (low prevalence of CLCG; fewer than 25% [LCLCG] and high prevalence of CLCG; over 75% [HCLCG]) and its correlation to pesticide exposure zones in the region of Picardy, France.

Methods

Patient selection

The included population in our retrospective study consisted of 633 couples who attended a reproductive medical center and who were part of an ICSI program between 2009 and 2011. Our study population is described in Table 1. In the selected couples, women were normo-responders (oocyte cohort over 5), under 35 years old, living in the Picardy, France region, and exhibited CLCG after oocyte morphology evaluation which was confirmed by a second embryologist (Fig. 1). We excluded couples with severe male infertility factors (severe oligoasthenoteratospermia, azoospermia, or high sperm DNA fragmentation of over 30%) and women aged over 35 in order to minimize the negative impact of female age and/or male factors on oocyte activation and subsequent embryo development [25].

All selected participants were divided into two groups based on prevalence of CLCG exhibited by total retrieved oocytes. The first group (LCLCG: low CLCG; $n = 83$) included a group of couples with oocytes exhibiting a low prevalence of CLCG under 25%. The second group (HCLCG: high CLCG; $n = 68$) included a group of couples with oocytes exhibiting a high prevalence of CLCG over 75%. The included patients in each group presented unremarkable clinical histories and comparable clinical features as shown in Table 1.

Information was also collected about couples' location residing in exposed areas considered as the risk zones of pesticide exposure which were evaluated according to the quantity of pesticide-derived active compounds found in surface water (expressed in g/ha of cultivable agricultural land).

Controlled ovarian stimulation

Couples underwent different controlled ovarian stimulation (COS) protocols based on the patient's profile and on the physicians' clinical preference, including long GnRH agonist protocols or antagonist protocols. For long GnRH

Table 1 Baseline characteristics of infertile couples undergoing ICSI and selected for CLCG oocyte evaluation

		LCLCG (n = 83)	HCLCG (n = 68)	p-value
Female characteristics	Age (years)	30 ± 6.4	29 ± 6.4	ns
	Tobacco use (%)	40%	31%	ns
	FSH level at day 3 (IU/mL)	6.1 ± 1.5	6.5 ± 2.3	ns
	E2 level at day 3 (pg/mL)	41.8 ± 12.3	42.9 ± 9.5	ns
	AMH (ng/mL)	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.3	ns
Male characteristics	Age (years)	34 ± 7.8	33 ± 5.5	ns
	Tobacco use (%)	36%	34%	ns
	Sperm concentration (x10 ⁶ /mL)	18 ± 16.5	22.5 ± 20.1	ns
	Sperm motility (%)	26%	30%	ns
	Normal morphology ^a (%)	23%	28%	ns
Infertility duration (years)		3.4 ± 1.9	3.6 ± 2.7	ns
Secondary infertility (%)		23%	20%	ns
Infertility type	Tubal factor	11%	18%	ns
	Ovulatory factor	24%	16%	ns
	Endometriosis	59%	59%	ns
	Uterine factor	8%	6%	ns
ICSI attempt		2 ± 1.1	2 ± 1.2	ns
COS characteristics	GnRH antagonist use (%)	15%	22%	ns
	COS duration (days)	11.6 ± 2.3	11.2 ± 1.9	ns
	FSH total dose (IU)	1967 ± 935	2219 ± 1203	ns
	E2 level at trigger day (pg/mL)	2760 ± 1142	2627 ± 1076	ns
	Endometrial thickness at trigger day (mm)	10.7 ± 1.8	10.9 ± 2	ns

Results are expressed as n(%) or mean (M) ± standard deviation (SD). A difference was considered significant (s) when $P < 0.05$; (ns): not significant
 LCLCG Low Centrally Located Cytoplasmic Granulation (CLCG) in a group of couples with oocytes exhibiting a low prevalence of CLCG of under 25%, HCLCG High CLCG in a group of couples with oocytes exhibiting a high prevalence of CLCG of over 75%, ICSI Intracytoplasmic Spermatozoa Injection, COS Controlled Ovarian Stimulation, FSH Follicle-Stimulating Hormone, AMH Anti-Müllerian Hormone, E2 Estradiol

^aSpermatozoa were evaluated by the Cohen-Bacrie modified morphology classification (normal forms ≥ 20%)

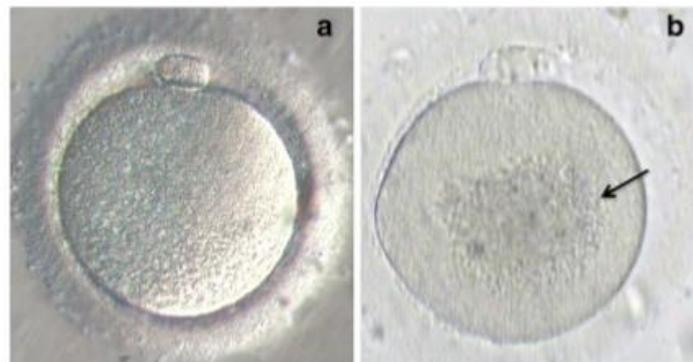


Fig. 1 Metaphase II oocytes observed by light microscopy (400x magnification): (a) normal oocyte morphology; (b) abnormal oocyte exhibiting centrally located cytoplasmic granular area (CLCG; black arrow)

agonist use, triptorelin was most often administered (Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Paris, France) initiated on day 20 of the previous cycle at a dose of 0.1 mg per day, followed 14 days later with half an ampule of triptorelin (0.1 mg per day) combined with FSH (Fostimon®, Genevrier, Sophia-Antipolis, France/Gonal-F®, Merck, Lyon, France/Puregon®, MSD, Levallois-Perret, France) or with hMG (Menopur®, Ferring SAS, St Prex, Switzerland). For antagonist protocols, the stimulation was started from day 2 of the cycle with FSH or hMG, with the initiation of cetrorelix (Cetrotide®, Merck, Lyon, France), 0.25 mg per day when the follicle size exceeded 14 mm or the estradiol (E2) level was over 400 pg/mL. The gonadotropin doses used for COS (FSH or hMG) were adjusted after the first ultrasound examination and E2, LH evaluations on day 7 of the gonadotropin administration. When at least three follicles had reached a diameter ≥ 17 mm, a dose of 250 μ g of recombinant human chorionic gonadotropin-rhCG (Ovitrelle®, Merck, Lyon, France) was administered and an oocyte trigger was performed 35 h after hCG administration. Luteal phase supplementation consisted of 400 mg per day of intra-vaginal micronized progesterone (Utrogestan®; Besins International, Paris, France) from the evening of oocyte retrieval until the β -hCG assay 15 days later.

ICSI procedure

For the ICSI procedure, the cumulus and corona radiata were removed mechanically under a dissecting microscope and with exposure to 0.5% hyaluronidase (Sigma Company, NY, USA) for 30 s. Sperm from partners was analyzed according to WHOM [27] and treated for ICSI. The treatment was performed after 18 h of incubation at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Oocytes were examined for the presence of two pronuclei as a sign of fertilization.

The resulting embryos were cultured up to day 3 [28]. Adequate embryo quality (good quality embryos; A + B) was defined based on the presence of uniform size and shape of blastomeres and fragmentation lower or equal to 10% [25]. Fewer than 3 of the best embryos were transferred at day 2 or 3 in utero using a Frydman catheter (CCD Laboratories, Paris, France) and other good quality embryos were cryopreserved.

Clinical pregnancy was confirmed by ultrasound imaging 6–8 weeks after embryo transfer with a β -hCG level above 1000 IU/L and calculated relative to the number of transferred cycles. Ongoing pregnancy was defined as pregnancy with more than 12 weeks of amenorrhea (WA). The miscarriage ratio was calculated relative to the number of clinical pregnancies after the first trimester and was classified as either early (before 12 WA) or late (12 to 20 WA). Each couple went through a single ICSI cycle during this study.

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) or percentage of the total. Data were analyzed with Student's *t*-test for comparison of mean values or with the chi-squared test for comparison of percentages using Statistical Package, version 6.0 (Statistica). Differences with a value of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Multivariate logistic regression analysis was used to test the association between the oocytes and CLCG prevalence and early miscarriages. Odds ratios (ORs) (95% confidence intervals [CI]) were calculated adjusting other involved factors on IVF clinical outcomes and considered significant when $p < 0.05$.

Results

Couples included in the study and undergoing the ICSI program presenting oocytes with LCLCG or HCLCG showed some differing embryological outcomes, particularly in the embryo cleavage rate (99% vs 82%, respectively) and the number of cryopreserved embryos per patient (1.8 vs 1.2, respectively). The difference in the embryo cryopreservation rate between groups was, however, not significant. In contrast, fertilization and embryo quality rates were not affected by the CLCG degree (Table 2).

Clinical outcomes revealed a highly significant difference between LCLCG and HCLCG groups expecting a clinical pregnancy rate. Compared to the LCLCG group, ongoing pregnancy and live birth rates were decreased in couples with HCLCG (32% and 30% vs 14% and 13%, respectively) and early and late miscarriage rates were increased (11% and 4% vs 47% and 12%) (Table 2). Moreover, after multivariate analysis, the OR (95%CI) for early miscarriages in the HCLCG group was 3.1 [2.1–4.1] ($p < 0.01$).

In addition, in order to demonstrate a correlation between the location of couples residing in exposed areas with high concentrations of pesticide (to define the risk zone) and degrees of CLCG exhibited by oocytes (LCLCG and HCLCG), Fig. 2 shows a significantly higher number of couples with HCLCG compared to those with LCLCG in risk zones. Zone 4 had a high pesticide exposure over 3000 g/ha, and HCLCG compared to LCLCG was 67% vs 33% ($p < 0.05$). In zones 1 and 2, there was a significantly lower HCLCG compared to LCLCG, but zone 3 did not show a significant difference between groups (Fig. 2).

Discussion

Since the beginning of implementation of ART to treat human infertility, oocyte quality has always been considered the most important key to IVF success, involving various variables to determine its final ability to produce a normal embryo. One-quarter of oocytes have double anomalies, 6% have triple anomalies, and 3% have abnormal shapes

Table 2 ICSI outcomes in couples compared to CLCG prevalence

	LCLCG (n = 83)	HCLCG (n = 68)	p-value	
Total number of oocytes	1178	943	-	
Oocytes per patient	14.1 ± 5.7	13.6 ± 5.5	ns	
MII per patient	10.4 ± 4.1	9.4 ± 4.2	ns	
Maturation rate (%)	(868/1178) 74%	(653/943) 69%	ns	
Embryological outcomes	Fertilization rate (%)	(577/868) 66%	(388/653) 59%	ns
	Cleavage rate (%)	(576/577) 99%	(321/388) 82%	0.04 (s)
	Best embryo quality (A + B) rate (%)	(358/576) 62%	(200/321) 62%	ns
	Embryo cryopreservation rate (%)	(150/423) 35%	(78/211) 37%	ns
	Cryopreserved embryos per patient	1.8 ± 0.5	1.2 ± 0.7	0.01 (s)
Total number of transferred embryos	153	110	-	
Transferred embryos per patient	1.9 ± 0.8	1.6 ± 1	ns	
Total embryo transfer cycles	79	55	-	
Clinical outcomes	Clinical pregnancy rate (%)	(28/79) 35%	(15/55) 27%	ns
	Early miscarriage rate (%)	(3/28) 11%	(7/15) 47%	0.01 (s)
	Ongoing pregnancy rate (%)	(25/79) 32%	(8/55) 14%	0.01 (s)
	Late miscarriage rate (%)	(1/25) 4%	(1/8) 12%	0.02 (s)
	Live birth rate (%)	(24/79) 30%	(7/55) 13%	0.01 (s)

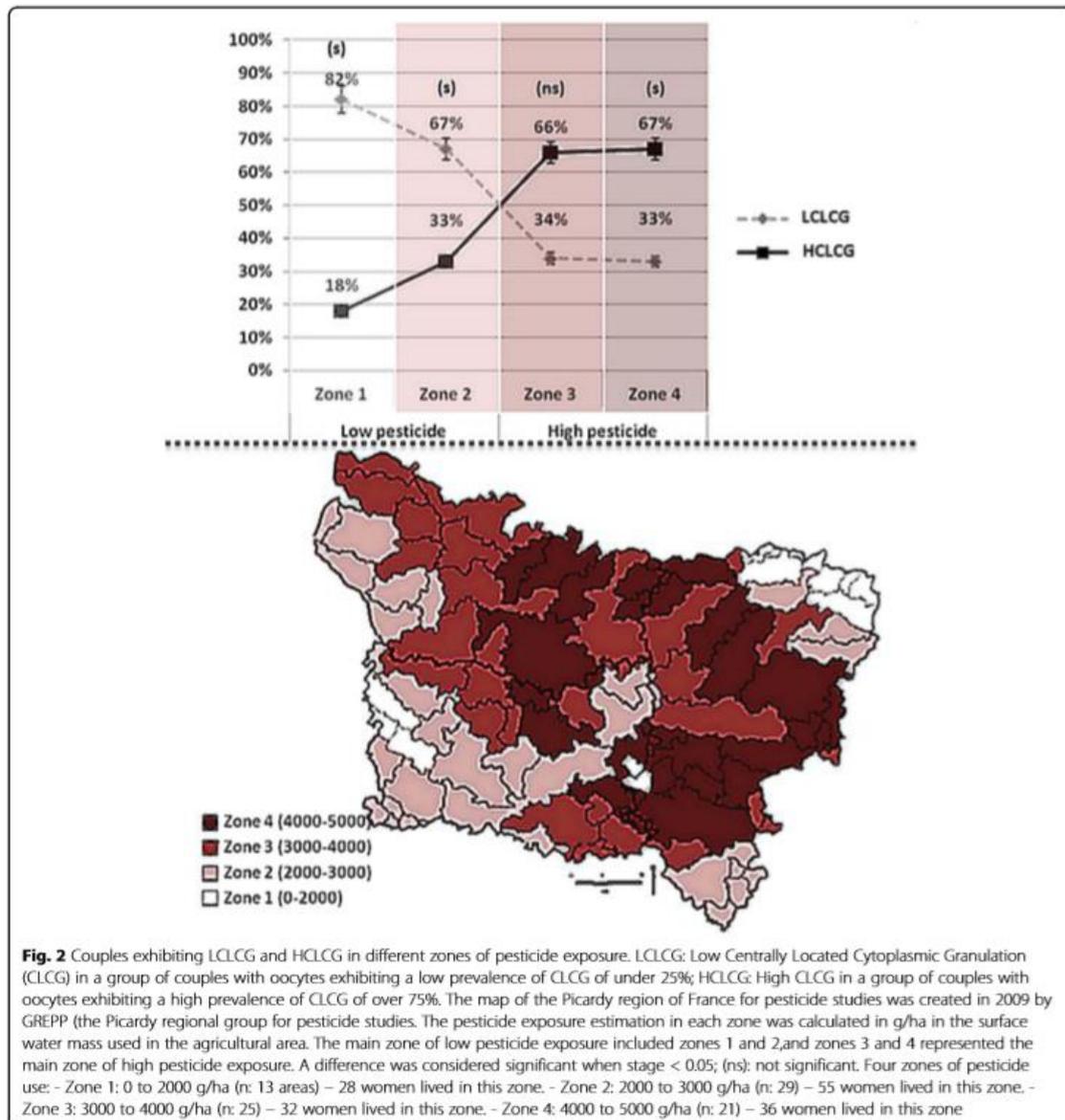
Results are expressed as n(%) or mean (M) ± standard deviation (SD). A difference was considered significant (s) when $P < 0.05$; (ns), not significant. LCLCG Low Centrally Located Cytoplasmic Granulation (CLCG) in a group of couples with oocytes exhibiting a low prevalence of CLCG of under 25%, HCLCG High CLCG in a group of couples with oocytes exhibiting a high prevalence of CLCG of over 75%, MII Metaphase II

[6, 8–10]. Furthermore, the most damaging oocyte dysmorphism is that linked to its cytoplasmic immaturity, as in the case of CLCG leading to heterogeneity in the oocyte cohort [14]. This condition is implicitly reflected in the problem of COS response with unbalanced ovarian microenvironment, resulting in a negative impact on IVF outcomes [26].

Several studies have shown that CLCG prevalence varies from 32% to 63% for mature oocytes, showing lack of consensus between several authors about the negative impact of CLCG on fertilization [11, 19], embryo cleavage [29], its quality [8, 14, 19] and its ability to reach blastocyst stage [5]. Nevertheless, almost of studies were more agreed about the negative impact of CLCG on clinical outcomes [3, 5, 6, 8, 11, 14, 29]. In our study, among 633 initial ICSI cycles, 482 couples (76%) had moderate CLCG with a prevalence of 26–74% and were excluded from our study to avoid the non-interpretable results with such a heterogeneous population. For this reason, we decided to focus on analyzing the ICSI

outcomes of couples with LCLCG (in 13% of initial cycles [83/633]) and those with HCLCG (in 11% of initial cycles [68/633]), suggesting that CLCG prevalence could have relative impact on ICSI outcomes.

It has been reported that CLCG presence affects the fertilization rate (OR [95%CI]: 1.22 [1.03–1.45]) [30] and Ebner et al. [5] were able to show the association between lower fertilization rate and CLCG. In our study, the negative effect on fertilization rate was not sufficient to be significant between LCLCG and HCLCG (Table 2), while other researchers failed to observe any impact of CLCG on fertilization rates [3, 4, 14, 20, 22, 27, 31–33]. This issue could be explained by the ability of endoplasmic reticulum in the oocyte to composite the intrinsic dysregulation by stimulating calcium flux after injection of spermatozoa by ICSI and assuring the necessary activation for fertilization despite CLCG presence [34–36], whereas oocytes with aggregation of the endoplasmic reticulum were associated with a lower fertilization rate and poor embryo quality [29, 31].



However, the correlation between CLCG exhibited by oocytes and their impaired developmental competence has been discussed in detail by many authors [6, 37, 38]. These works confirm our results regarding embryo cleavage rate (99% for LCLCG vs 82% for HCLCG) (Table 2). Nevertheless, discrepancies between studies that show a difference in cleavage rates could be explained by the involved other factors on embryo cleavage decrease. Among them, we can cite in one hand the lack of rigorous oocyte morphology evaluation including other possible less apparent of oocyte

dysmorphisms. In the other hand, there is risk of sperm genome decays presence on the selected spermatozoa for ICSI which is morphologically normal [25].

Moreover, Ebner et al. [5] proved the negative correlation between CLCG and blastulation rate (44%). Contrary to previous findings on embryo cleavage rate, some authors did not find lowered in vitro developmental ability in oocytes with CLCG compared to those with complete absence of granulation in the cytoplasm [14, 20, 29, 32]. When other cytoplasmic features were compared

to CLCG, the assessment of their predictive value showed less consistent results, whereas CLCG presence showed the strongest association with a value of f 2.7 presenting the major point in the Rienzi's score (Metaphase II oocyte morphological scoring system MOMS) [3]. The negative impact of CLCG on embryonic morphology could not be significantly demonstrated [4]. It could not be proved for the embryo quality rate either, with a risk of 1.15 [0.56–2.36] [33]. Generally, oocyte morphology could affect embryo cleavage contrarily to embryo quality. There was no real significant difference between abnormal extra-cytoplasmic or cytoplasmic morphological features in oocytes [39–41]. This could explain why we found a significant difference in embryo cleavage rate and not in embryo quality rate (Table 2). With more available embryos, it was easier to obtain more cryopreserved embryos from an oocyte cohort with a CLCG under 25% (two embryos per patient) than those with a CLCG over 75% (one embryo per patient) (Table 2). Nevertheless, Balaban et al. [37] reported that embryos derived from oocytes with CLCG had decreased survival rate and impaired *in vitro* development after cryopreservation. Hence, the cryopreservation of embryos issued from dysmorphic oocytes need to be studied, perhaps using a genetic evaluation and aneuploidy testing is still unclear and has sparked a debate among authors [14, 15, 18, 32, 42, 43].

With a selection based only on morphological features from MII oocytes until the embryo transfer stage, seemingly appropriate and normal but intrinsically the impaired embryos might be transferred, resulting in poor clinical outcomes [16]. Balaban and Urman [29] did not find any effect comparing all oocyte anomalies with miscarriage rates (20% for abnormal oocytes vs 14% for normal oocytes) nor with pregnancy rates in CLCG compared to a control group (39% and 42%, respectively). However, most oocytes with an abnormal morphology have been shown to be associated with a poor implantation or pregnancy rate [6, 8, 9, 14, 19, 32, 34, 39]. Indeed, significantly lower pregnancy rates were reported with oocytes with cytoplasmic anomalies (3% for abnormal oocytes vs 24% for normal oocytes) [44]. In the present study, we were able to demonstrate a clear negative impact of HCLCG compared to LCLG on clinical outcomes including ongoing pregnancy and live birth rates which were decreased in couples with HCLCG (32% and 30% vs 14% and 13%, respectively) (Table 2), as confirmed by the study of Kahraman et al. [14]. Nevertheless, though the pregnancy rate was affected by CLCG presence as reported by some authors [6, 14, 23]; the difference in pregnancy rate between groups in the present work was not significant. Wilding et al. [20] also reported these findings, demonstrating the need to calculate the study power with more consistent study populations. However, this result could be explained by a possible presence of embryonic

aneuploidies [14, 16, 18, 25, 34, 35] issued from oocytes with CLCG which are responsible for implantation failures before clinical pregnancy. There is probable involvement of other intra-uterine dysregulating factors [28] which are associated with oocyte dysmorphism [11, 13, 35].

Early miscarriage rates in our study were increased from 11% for LCLCG to 47% for HCLCG, and this result was confirmed after multivariate analysis, resulting in a risk of 3.1 (2.1–4.1) when CLCG was over 75% (Table 2). This topic was previously elucidated by Otsuki et al. [11] and Ebner et al. [5], highlighting the association between CLCG and other cytoplasmic organelle dysregulations involving the endoplasmic reticulum and the mitochondria with high levels of oxidative stress and division spindle anomalies [11, 14, 35]. This condition could produce aneuploidies [1, 11, 14, 34] and could very well explain why Otsuki et al. [11] could report the case of a newborn with Beckwith-Wiedemann syndrome, a genetic imprinting disorder affecting chromosome 11p15.5, associating it with oocyte dysmorphism with sERC. They suggested that it was linked to CLCG production in oocytes whereas the endoplasmic reticulum in the oocyte stores and redistributes calcium, enabling cell activation during fertilization and energy accumulation by mitochondria necessary for appropriate embryo cleavage and an eventual maintained pregnancy [34–36]. Although there is no clear difference between oocyte dysmorphisms based on oocyte morphology evaluation, other investigations are needed to explore further associations between each oocyte morphologic anomaly and aneuploidy affecting clinical outcomes as well as epigenetic modifications with a risk of impairment of offspring [45].

Although several authors are debating the effect of oocyte dysmorphism on clinical outcomes [6, 8, 9, 19–22], we cannot neglect the importance of oocyte morphology evaluation particularly when it is directly correlated to the negative effect of toxic environments.

Indeed, a large proportion of human oocytes resulting from exogenous gonadotropin-stimulated cycles have different morphological attributes or dysmorphisms [12, 42]. Conversely, other authors did not find negative effects of COS protocol on oocyte quality and IVF outcomes [3, 7, 39] involving other factors such as female age [46], AMH, total FSH dose, COS duration [5], or estradiol level [47].

Apart from the toxic intra-ovarian environment produced intrinsically by COS with exogenous gonadotropins, the developing ovarian organ is particularly sensitive to environmental harm caused by pesticide exposure affecting oocyte quality [48].

Some pesticides, (e.g. dichlorodiphenyltrichloroethane [DDT], methoxychlor, DES, and vinclozolin) are endocrine disruptors with estrogen-like effects. In women, exposure to bisphenol A affects folliculogenesis (via the

granulosa and theca cells [49]), induces meiotic aberrations (aneuploidy), and leads to a decreased oocyte quality during IVF.

In contrast, diethylstilbestrol (DES), which represents a well-studied estrogenic chemical, was proved in murine model to cause oocyte dysmorphism with condensed chromatin along the nuclear membrane [45], ovarian cysts, and ovarian tumors [50]. DDE, the most stable metabolite of DDT, and vinclozolin are persistent organic pollutants in follicular fluid, targeting androgen receptors. They stimulate aromatase and act in synergy with FSH to induce a premature rise in estradiol levels, affecting oocyte maturation. In addition, they have been found to induce the intra-ovarian inflammatory process involving VEGF and IGF-1; negatively affecting intra-ovarian mechanisms [51–54]. Moreover, methoxychlor (MXC), an organochlorine pesticide, has had anti-estrogen activity in the ovary [55], inhibiting growth and inducing atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway with an effect on AMH production [54].

It is known that the fetus is particularly vulnerable to pesticide exposure because of its rapid growth, the sensitivity of its developing organs, and the immaturity of its metabolic pathways and enzymatic defenses. A Canadian study described an association between pesticide exposure and increased miscarriage rate [56], contrary to Willis et al. [57] in a Californian study. In our study focusing on the region of Picardy, France, pesticide exposure zones were relatively correlated to CLCG prevalence as the risk zone having the highest pesticide exposure over 3000 g/ha was the residence place of 67% of couples with HCLCG compared to 33% of couples with LCLCG (Fig. 2).

The limitations of our study relate to our lack of data on the type of pesticides used (because one can legitimately consider that different types of products have different effects), the impact of meteorological and hydrological conditions which can modify the pesticide profile, and the type of exposure (acute or chronic). Moreover, despite this study was focused on evaluation of the correlation presence between residence couples included in risk zones of pesticides exposure and CLCG, this issue cannot prove the exposure occurrence especially that duration of residence was unknown. Nevertheless, this study could to demonstrate a relative correlation between pesticide exposure and risk of CLCG and the extension of this study will be the evaluation of different pesticide concentrations in serum and follicular fluid to establish the causality of certain compounds on oocyte quality, embryonic development, and clinical outcomes.

Conclusion

Further special attention paid to oocyte morphology evaluation with cytoplasmic attributes, including CLCG among other oocyte dysmorphisms, could indirectly

reflect a dysregulated intra-ovarian microenvironment involving various variables and impaired oocyte maturation affecting ICSI clinical outcomes. The high prevalence of CLCG exhibited by the oocyte cohort over 75% might be a predictive factor for early miscarriage risk. In addition, risk zones with high pesticide exposure demonstrated more risk of oocytes with a high prevalence of CLCG. There is a real need for investigating pesticide components and their associations with oocyte dysmorphism, including CLCG features, aneuploidy evaluation, and ICSI outcomes.

Abbreviations

ART: Assisted reproductive technologies; aSERI: smooth endoplasmic reticulum; BPA: antiandrogenic endocrine disruptors; bisphenol A; CLCG: Centrally located cytoplasmic granulation; COS: Controlled ovarian stimulation; DDE: 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene; DES: Diethylstilbestrol; E2: Estradiol; HCLCG: High prevalence of CLCG; HPTC: 2,2-Bis [p-hydroxyphenyl]- 1,1,1-trichloroethane; LCLCG: Low prevalence of CLCG; MII: Metaphase II; MXC: Methoxychlor; sERC: Smooth endoplasmic reticulum clusters; WA: Weeks of amenorrhea

Acknowledgements

We thank Séverine C and Ingrid K from the embryology laboratory for their support of this study.

Funding

This work was supported by grants from the regional university hospital and school of medicine of Amiens, France.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available due to the ongoing further analysis and study based on the current study, but they are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

All authors discussed the results and commented on the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the local independent ethics committee. The authors declare that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the 1975 declaration of Helsinki as revised in 2008.

Author details

¹Ob/Gyn Department, Regional University hospital, Morvan University, 29200 Brest, France. ²ART and Reproductive Biology laboratory, University hospital and school of medicine, Picardie University Jules Verne, CHU Sud, 80054 Amiens, France. ³PERITOX-INERIS laboratory, CURS, Picardie University Jules Verne, CHU Sud, 80054 Amiens, France. ⁴Forte Bio et Unilabs France, 1 Rue Mozart, 92200 Clichy La Garenne, France.

Received: 16 January 2017 Accepted: 6 June 2017

Published online: 10 July 2017

References

1. Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech.* 1990;16:324–46.

2. Veek L. Oocyte quality and assisted conception. *Acta Eur Fert.* 1992; 23: 275–288.
3. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update.* 2010;17:34–45.
4. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:595–7.
5. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *RBM Online.* 2006;12:507–12.
6. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *FertilSteril.* 2008;90:1692–700.
7. Cota AM, Oliveira JB, Petersen CG, Mauri AL, Massaro FC, et al. GnRH agonist smooth endoplasmic reticulum in assisted reproduction cycles: oocyte morphology. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:33. doi:10.1186/1477-7827-10-33.
8. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, et al. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12:1267–70.
9. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, et al. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13:3431–3.
10. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, et al. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000;15:427–30.
11. Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod.* 2004;19:1591–7.
12. Sa R, Cunha M, Silva J, Luis A, Oliveira C, et al. Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications. *FertilSteril.* 2011;96:143–9.
13. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:263–70.
14. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000;15:2390–3.
15. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008;14:159–77.
16. Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, et al. The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn.* 2004;24:307–11.
17. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 1992;7:379–90.
18. Plachot M. Chromosomal abnormalities in oocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;183:59–63.
19. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod.* 1997;12:1750–5.
20. Wilding M, Di ML, D'Andretti S, Montanaro N, Capobianco C, Dale B. An oocyte score for use in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:350–8.
21. Ubaldi F, Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta.* 2008;29:115–20.
22. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, et al. Intracytoplasmic sperm injection in dysporphic human oocytes. *Zygote.* 1995;3:283–8.
23. Schmutzler AG, Acar-Perk B, Weimer J, Salmassi A, Sievers K, et al. Oocyte morphology on day 0 correlates with aneuploidy as detected by polar body biopsy and FISH. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289:445–50.
24. Pocar P, Brevini TA, Fischer B, Gandolfi F. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction.* 2003;125:313–25.
25. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, et al. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *FertilSteril.* 2001;75:525–31.
26. Benkhalifa M, Madkour A, Louanjli N, Bouamoud N, Saadani B, et al. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. *Exp Rev Proteom.* 2015;12:407–23.
27. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
28. Madkour A, Bouamoud N, Louanjli N, Kaarouch I, Copin H, et al. Intrauterine insemination of cultured peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer improves clinical outcome for patients with repeated implantation failures. *Zygote.* 2016;24:58–69.
29. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *RBM Online.* 2006;12:608–15.
30. Figueira RC, Braga DP, Semiao-Francisco L, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Oocyte yield and dysmorphisms as indicators of biological efficiency in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Fertil (Camb).* 2011;14:41–7.
31. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *RBM Online.* 2007;14:40–8.
32. Yakin K, Balaban B, Isiklar A, Urman B. Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo. *FertilSteril.* 2007;88:811–6.
33. Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli A Jr, et al. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *Eur J ObstetGynecolReprod Biol.* 2011;159:364–70.
34. Sousa M, Cunha M, Silva J, Oliveira E, Pinho MJ, et al. Ultrastructural and cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2016:1–7.
35. Seidler EA, Moley KH. Metabolic determinants of mitochondrial function in oocytes. In seminars in reproductive medicine. Thieme Medical Publishers. 2015;33:396–400.
36. Kovalskaya EV, Makarova NP, Syrkasheva AG, Dolgushina NV, Kurilo LF. Mechanisms of smooth endoplasmic reticulum aggregates creation in oocyte's cytoplasm in IVF cycles and its clinical relevance. *Tsitologia.* 2015; 57:129–34.
37. Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Hum Reprod.* 2008;23:1778–5.
38. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommergruber M, Yaman C, et al. Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development. *RBM Online.* 2008;16:801–7.
39. Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Maglia E, et al. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos. *RBM Online.* 2006;13:661–7.
40. Ashrafi M, Karimian L, Eftekhari-Yazdi P, Hasani F, Arabipour A, et al. Effect of oocyte dysmorphisms on intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in normal ovarian responders. *J ObstetGyn Res.* 2015;41:1912–20.
41. Yu EJ, Ahn H, Lee JM, Jee BC, Kim SH. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. *ClinExpReprod Med.* 2015;42:156–62.
42. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2007;22:980–8.
43. Dolgushina NV, Syrkasheva AG, Makarova NP, Kovalskaya EV, Kalinina EA, et al. Correlation between oocyte morphology and the embryo aneuploidy rate in IVF cycles. *GynecolEndocrin.* 2015;31:61–4.
44. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Millings S, Dendrinis S, et al. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *FertilSteril.* 1999;72:240–4.
45. Maranghi F, Tassinari R, Moracci G, Macri C, Mantovani A. Effects of a low oral dose of diethylstilbestrol (DES) on reproductive tract development in F1 female CD-1 mice. *ReprodToxicol.* 2008;26:146–50.
46. Stoop D, Ermini B, Polyzos NP, Haentjens P, De Vos M, et al. Reproductive potential of a metaphase II oocyte retrieved after ovarian stimulation: an analysis of 23 354 ICSI cycles. *Hum Reprod.* 2012;27:2030–5.
47. Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, et al. Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *RBM Online.* 2006;12:340–6.
48. Dominguez MA, Sadeu JC, Guerra MT, Furlong HC, Baines S, et al. Ovarian toxicity of environmental contaminants: 50 shades of Grey. In *TranslatToxicol Springer International Publishing.* 2016:215–44.
49. Fujimoto YY, Kim D, vom Saal FS, Lamb JD, Taylor JA, et al. Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fert Steril.* 2011;95:1816–1819.

50. Newbold R. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect.* 1995;103:83–7.
51. Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kempainen JA, et al. Persistent DDT metabolite p, p'DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 1995;375:581–5.
52. Kelce WR, Monosson E, Gamcsik MP, Laws SC, Gray LE. Environmental hormone disruptors: evidence that vindozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *ToxicolApplPharmacol.* 1994;126:276–85.
53. Chedrese PJ, Feyles F. The diverse mechanism of action of dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and methoxychlor in ovarian cells in vitro. *ReprodToxicol.* 2001;15:693–8.
54. Holloway AC, Petrik JJ, Younglai EV. Influence of dichlorodiphenylchloroethylene on vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor in human and rat ovarian cells. *ReprodToxicol.* 2007;24:359–64.
55. Hall DL, Payne LA, Putnam JM, Huet-Hudson YM. Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. *ReprodToxicol.* 1997;11:703–8.
56. Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ HealthPerspect.* 2001;109:851–7.
57. Willis WO, de Peyster A, Molgaard CA, Walker C, MacKendrick T. Pregnancy outcome among women exposed to pesticides through work or residence in an agricultural area. *J Occup Med.* 1993;35:943–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3. **Présentation de l'article intitulé « Qualité ovocytaire en FIV et exposition aux pesticides ».**

Article accepté dans « Médecine de la Reproduction », en cours de corrections en octobre 2018.

Introduction – Objectifs

Cet article fait le point sur l'effet des pesticides et d'autres polluants sur la qualité ovocytaire. Certains pesticides sont connus pour être des perturbateurs endocriniens, exerçant sur la fertilité divers effets, en fonction du type de produits et du stade de développement ovarien. Ils sont en outre susceptibles de persister longtemps dans l'organisme, entraînant des troubles durant l'enfance ou à l'âge adulte.

Matériel et Méthode

Nous avons étudié l'effet des pesticides dans un groupe de jeunes femmes prises en charge pour une Fécondation In Vitro (FIV) avec Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïdes (ICSI) et dont les cohortes ovocytaires révélaient une très forte proportion d'ovocytes avec une zone centrale cytoplasmique de granulations (CLCG). **Résultats**

Notre étude a révélé que le risque de fausses-couches précoces du premier trimestre de la grossesse était dans ce cas multiplié par trois (significatif). Cette donnée, ainsi que des anomalies de fécondation, de clivage et d'implantation ont été rapportées par d'autres auteurs.

Conclusion

A l'avenir, une meilleure connaissance des produits incriminés et de la durée de l'exposition permettra de mieux définir leurs impacts sur la santé humaine.

Qualité ovocytaire en fécondation *in vitro* et exposition aux pesticides

Oocyte quality in in vitro fertilization and pesticide exposure

Philippe Merviel^{1,2}
Rosalie Cabry^{3,4}
Karen Chardon⁴
Emmanuelle Lourdel³
Florence Scheffler^{3,4}
Naima Mansouri⁵
Aviva Devaux^{4,5}
Véronique Bach⁴
Henri Copin⁵
Moncef Benkhalifa^{4,5}

¹ Service de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction, CHRU Brest, France

² Université de Bretagne Occidentale, Brest, France
<philippe.merviel@chu-brest.fr>

³ Centre d'assistance médicale à la procréation, CHU Amiens, France

⁴ Laboratoire Peritox-Ineris, université Picardie Jules Verne, Amiens, France

⁵ Laboratoire de biologie de la reproduction et cytogénétique, CHU Amiens, France

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : P. Merviel

Résumé. Cet article fait le point sur l'effet des pesticides et d'autres polluants sur la qualité ovocytaire. Certains pesticides sont connus pour être des perturbateurs endocriniens, exerçant sur la fertilité divers effets, fonction du type de produit et du stade du développement ovarien. Ils sont en outre susceptibles de persister longtemps dans l'organisme, entraînant des troubles durant l'enfance ou à l'âge adulte. Nous avons étudié l'effet des pesticides dans un groupe de jeunes femmes prises en charge pour une fécondation *in vitro* (FIV) avec injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) et dont les cohortes ovocytaires révélaient une très forte proportion d'ovocytes avec une zone centrale cytoplasmique de granulations (CLCG). Notre étude a révélé que le risque de fausses couches précoces du premier trimestre de la grossesse était dans ce cas risque multiplié par 3 (significatif). Cette donnée, ainsi que des anomalies de fécondation, de clivage et d'implantation ont été rapportées par d'autres auteurs. À l'avenir, une meilleure connaissance des produits incriminés et de la durée de l'exposition permettra de mieux définir leurs impacts sur la santé humaine.

Mots clés : pesticides, ovocyte, fausse couche spontanée, perturbateurs endocriniens

Abstract. The purpose of this article is to resume the effect of pesticides and other pollutants on oocyte quality. Some pesticides are known to be endocrine disruptors, with an impact on fertility depending on the type of product and the stage of ovarian development. In addition, they can persist for a long time in the body that is experiencing disorders during childhood or adulthood. We investigated the effect of pesticides in a group of young women supported in IVF-ICSI and whose oocyte cohorts revealed a very high proportion of oocytes with a central located granular cytoplasm (CLCG). Our study revealed a 3-fold (significant) risk of early miscarriage of the first trimester of pregnancy in this case. This data, as well as anomalies of fertilization, cleavage and implantation were also found by other authors. In the future, the best knowledge of the products involved and the duration of the exposure will help to better define their impacts on human health.

Key words: pesticides, oocyte, early miscarriage, endocrine disruptors

L'impact des pesticides sur la qualité ovocytaire en fécondation *in vitro* (FIV) a été peu étudié à ce jour. Certains pesticides sont connus pour interférer avec le système endocrinien ovarien (stéroïdogénèse) et thyroïdien, du fait d'une parenté chimique entre l'œstradiol et l'octylphénol ou le bisphénol A, et entre la thyroxine dichlorodiphényltrichloréthane (DDT) ou le polychlorobiphényle (PCB) [1]. Ainsi, l'atrazine, la cyperméthrine, le DDT, la dieldrine, le méthoxychlore (MXC) et la vinclozoline sont des perturbateurs endocriniens aux effets œstrogène-like. Les différents pesticides et autres produits chimiques sont rappelés dans le *tableau 1* [1]. Leur toxicité sur l'ovaire dépend du type de produit en cause et du stade

de développement ovarien. On sait que le fœtus est exposé et particulièrement vulnérable aux pesticides, en raison de sa croissance rapide, de la sensibilité de ses organes en développement, de l'immaturité de ses voies métaboliques et de ses défenses enzymatiques. À terme, la destruction des follicules peut conduire à une insuffisance ovarienne définitive.

À ce jour, l'observation de la qualité ovocytaire au laboratoire d'assistance médicale à la procréation (AMP) est basée uniquement, en FIV avec micro-injection intracytoplasmique des spermatozoïdes (ICSI), sur l'aspect morphologique de l'ovocyte, qui ne reflète que très partiellement sa maturation et sa compétence à être fécondé et à conduire à

Tableau 1. Pesticides et produits chimiques suspectés ou connus comme perturbateurs endocriniens (Données extraites de P Pocar et al. [1])

Classes	
Herbicides et fongicides	
Acide dichlorophénoxyacétique (2,4-D)	Benomyl
Acide trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T)	Mancozeb
Alachlor	Zineb
Amitrole	Complexe Metriam
Atrazine	Maneb
Métyribuzin	Ziram
Nitrofen	Tributylin
Trifluralin	Hexachlorobenzène
Insecticides	
Benzènehexachlorocyclohexane (B-HCH)	Oxychlorane
Méthoxychlor	Dicofol
Toxaphène	Heptachlor ou heptachlor époxyde
DT et métabolites (DDE)	Dieldrin
Carbaryl	Parathion
Endosulfan	Méthomyl
Mirex	Lindane (Y-HCH)
Transnonachlor	Pyréthroides synthétiques
Chlordane	Chlordécone (Kepone [®])
Nématocides	
Aldicarb	1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP)
Chimiques industriels	
Dioxines	De penta- à nonyl-phénols
Biphényles polychlorinés (PCBs)	Phtalates
Polybrominate biphényles (PBBs), pentachlorophénol (PCP)	Styrènes

un développement embryonnaire. Ainsi, il est admis qu'un ovocyte en métaphase II de bonne qualité présente un cytoplasme modérément granuleux, sans vacuoles, avec un espace périvitellin fin, un globule polaire non fragmenté et une zone pellucide ronde, homogène et peu dense [2, 3]. Plusieurs auteurs ont rapporté que plus de la moitié des ovocytes récupérés présentaient une ou plusieurs anomalies [4, 5], comme une zone pellucide anormale, un espace périvitellin élargi, des vacuoles, des corps rétractiles [2], une augmentation de la granularité du cytoplasme, des agrégations du réticulum endoplasmique ou encore une fragmentation ou une dégénérescence du premier globule polaire (figure 1) [6].

Les ovocytes à zone centrale de cytoplasme granuleux

La notion de zone centrale de cytoplasme granuleux ovocytaire (CLCG, pour *central located granular cytoplasm*) a été définie par Serhal en 1997 [7] comme la présence de granulations centrales plus denses que le cytoplasme adjacent avec une délimitation nette. L'origine de ces granulations semble correspondre à des tubules et à des vésicules du réticulum endoplasmique – sous forme de clusters, selon Otsuki [8] (sERC pour *smooth endoplasmic reticulum cluster*) – et entourés d'une population de mitochondries selon Sa [9] (aSERT pour *large aggregate of tubular smooth endoplasmic reticulum*). Lorsque plus de 50 % du cytoplasme est occupé par ces granulations avec une apparence de cratère à bords nets, l'aspect est dit sévère. Dans les autres cas (moins de 50 % du cytoplasme et bords peu différenciés), la cotation est dite légère. Kahraman [10] rapporte que cet aspect peut être présent dans les ovocytes au cours de plusieurs cycles successifs et que les femmes peuvent avoir des cohortes contenant plus ou moins d'ovocytes à cytoplasme granuleux. La fréquence des cohortes ovocytaires avec CLCG est variable selon les études : 2,72 % pour Kahraman [10], 4,2 % (63,1 % des ovocytes MII) pour Balaban [11], 9,4 % des cas pour Otsuki (34,4 % des ovocytes MII) [8], 6,2 % pour Ebner [5] et 5,3 % pour Rienzi (31,7 % d'ovocytes à cytoplasme granuleux) [12]. Le rôle du cytoplasme ovocytaire concerne le développement embryonnaire précoce (de la fécondation au troisième jour du développement), et toute anomalie de celui-ci (réticulum endoplasmique participant à la traduction des ARN maternels et/ou mitochondries) peut influencer sur la cinétique du clivage embryonnaire précoce.

Étude clinique sur les ovocytes à zone centrale de cytoplasme granuleux en fécondation *in vitro*

Nous avons décidé de mener une étude sur les ovocytes à zone centrale de cytoplasme granuleux en FIV + ICSI [13], suite à l'observation, en 2010, d'une baisse des résultats en termes de grossesses évolutives du centre d'AMP du CHU d'Amiens. Nous avons en effet mis en place une analyse longitudinale de nos résultats globaux (ensemble des tentatives) et de ceux concernant les « top tentatives » (définies par une première ou une deuxième tentative pratiquée chez des femmes de moins de 35 ans, avec un ou deux embryons de top qualité transférés). En 2009, nos résultats globaux en termes de grossesses évolutives étaient de 32,9 %/transfert et de 50 %/transfert pour les top tentatives. Ces valeurs n'étaient plus, en 2010 que de 23,9 et 38 %/transfert, respectivement. Or, la seule cause envisageable était une augmentation de la proportion de femmes présentant des cohortes ovocytaires avec

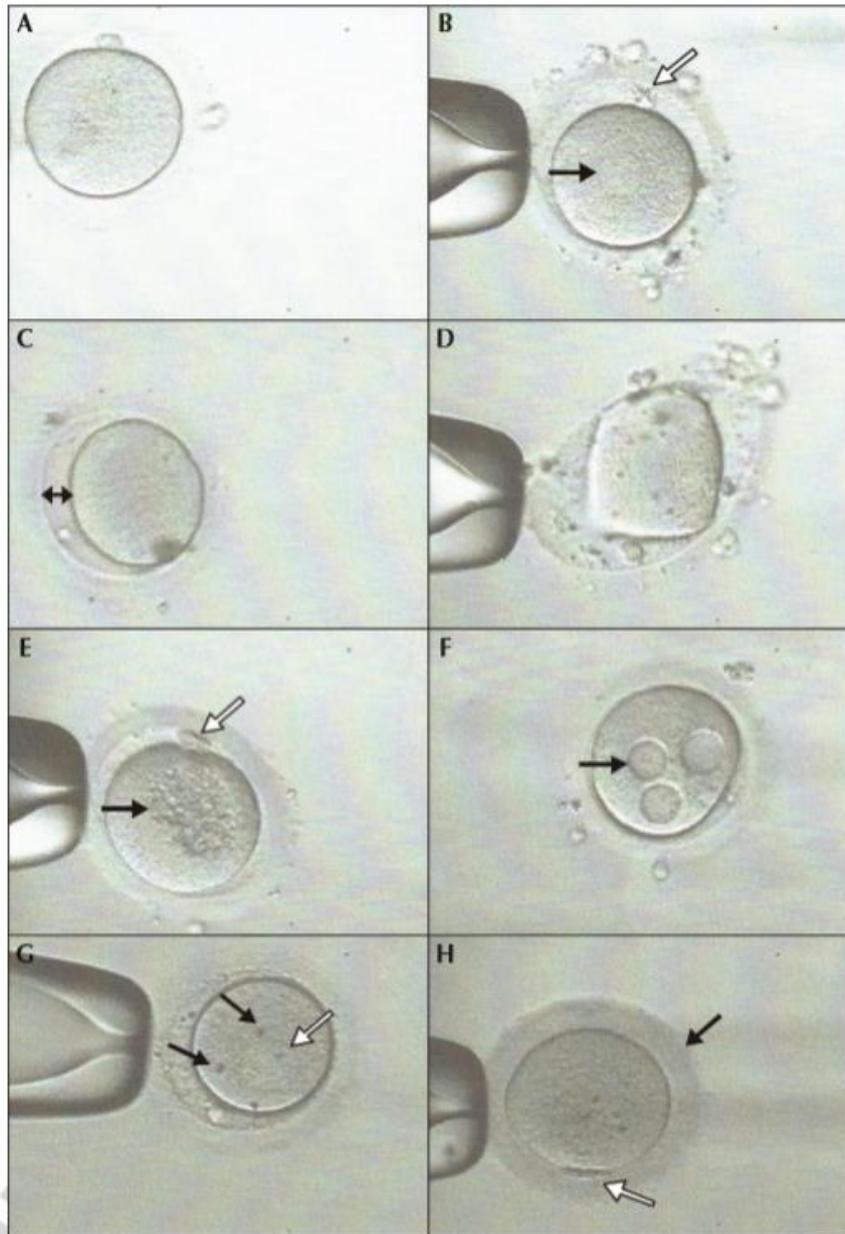


Figure 1. Anomalies morphologiques ovocytaires observées dans l'étude de AM Cota *et al.* [6]. **A)** aspect ovocyttaire normal ; **B)** agrégation du réticulum endoplasmique et globule polaire anormal ; **C)** espace périvitellin élargi ; **D)** forme ovocyttaire anormale ; **E)** granulation cytoplasmique centrale et globule polaire anormal ; **F)** vacuoles cytoplasmiques ; **G)** agrégation du réticulum endoplasmique et corps rétractiles ; **H)** zone pellucide sombre et globule polaire anormal

CLCG. La situation du centre d'AMP du CHU d'Amiens en Picardie, région agricole où les pesticides sont abondamment utilisés, nous a incités à rechercher une cause environnementale (via les pesticides) à la forte présence d'ovocytes avec CLCG chez certaines femmes et à étudier les résultats de la FIV avec ICSI chez celles-ci. Cette étude

a été faite en collaboration avec le laboratoire Peritox-Ineris (travaillant sur l'impact de l'environnement en santé humaine) de l'université Picardie-Jules Verne d'Amiens. En Picardie, 91 % des 4 288 tonnes de pesticides utilisés le sont dans l'agriculture (insecticides, herbicides, fongicides et rodenticides) ; les autres (les biocides) sont utilisés dans

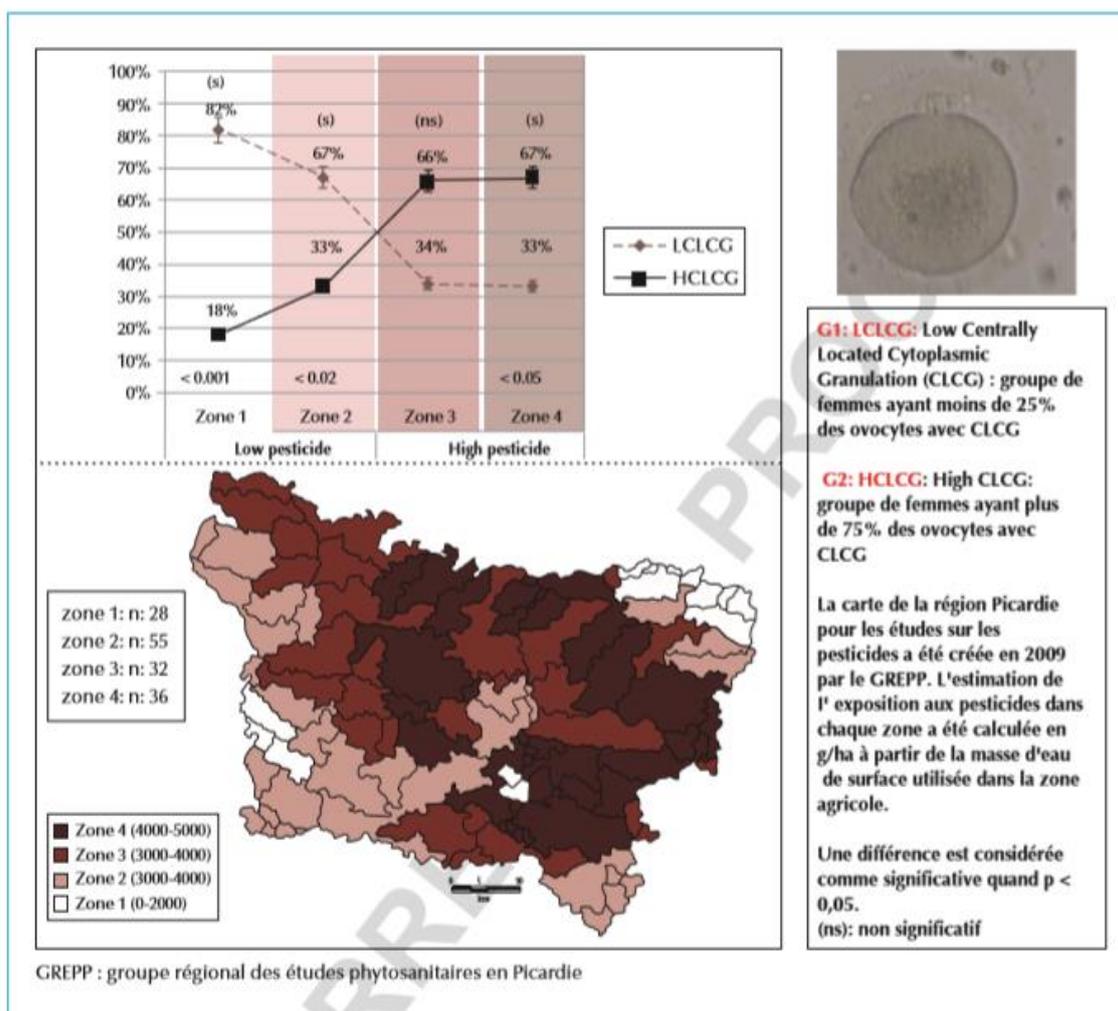


Figure 2. Corrélations entre la fréquence des ovocytes avec CLCG et l'exposition aux pesticides en Picardie (Données extraites de l'article de Merviel *et al.* [13]).

le traitement du bois et des textiles, ainsi que le milieu hospitalier (désinfection).

Notre étude a porté sur deux groupes de femmes de moins de 35 ans, prises en charge pour ICSI après recueil d'une cohorte ovocytaire d'au moins cinq ovocytes. Le groupe 1 était constitué de quatre-vingt-trois femmes chez qui moins de 25 % des ovocytes de la cohorte présentaient une CLCG sévère ; le groupe 2 de soixante-huit femmes chez qui ce type d'ovocyte représentait plus de 75 % de la cohorte. Dans cette étude, la fréquence des cohortes ovocytaires avec plus de 75 % de CLCG était particulièrement élevée : 21,1 % (68/321 ponctions folliculaires en vue d'ICSI chez des femmes de moins de 35 ans durant la même période d'étude), ce qui nous a fait suspecter un facteur environnemental. Outre les résultats de la prise en charge en ICSI, nous nous sommes éga-

lement intéressés à la profession des femmes et à leur lieu d'habitation. Étaient considérés comme métiers « à risque » les agricultrices ou femmes d'agriculteur, les paysagistes, les infirmières et aides-soignantes, les femmes de ménage, les personnels des industries du bois et du textile. L'imprégnation aux pesticides du lieu d'habitation a été évaluée par la quantité de substances actives issues des pesticides retrouvées dans les masses d'eau superficielles, exprimée en grammes/hectare de surface agricole utile, à partir d'une carte communale de la région Picardie établie en 2009 par le groupe régional des études phytosanitaires de Picardie (Grepp). Ces données se présentaient comme suit : treize communes présentaient de 0 000 à 2 000 g/ha, vingt-neuf de 2000 à 3 000 g/ha, vingt-cinq de 3000 à 4000 g/ha et vingt et une de 4000 à 5000 g/ha.

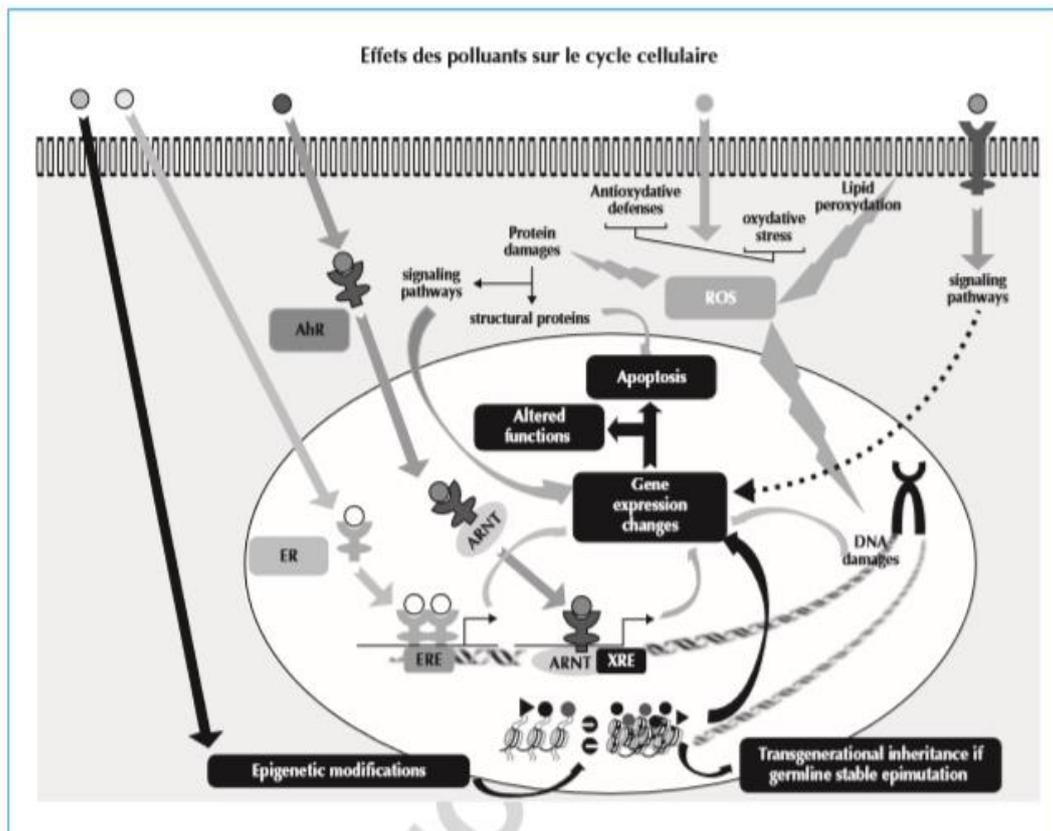


Figure 3. Mécanismes d'action cellulaire des différents polluants, dont les pesticides (données extraites de Vabre *et al.* [21]). AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques ; ER : récepteur aux œstrogènes ; ROS : radicaux libres de l'oxygène ; ARNT : transporteur nucléaire de l'AhR ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes ; XRE : élément de réponse aux xénobiotiques

Nous avons montré que les paramètres préthérapeutiques des couples pris en charge étaient comparables entre les deux groupes. Nous avons observé une différence significative entre les deux groupes concernant le taux de fécondation et le taux de clivage (66,5 % dans le groupe 1 *versus* 49,1 % pour le groupe 2 ; $p < 0,05$), bien que le nombre moyen d'ovocytes recueillis et celui d'ovocytes matures (métaphase II) soient identiques. Si le nombre d'embryons transférés et le taux de grossesse clinique par transfert n'étaient pas différents, le taux de grossesse évolutive et le taux d'accouchement par transfert dans le groupe 2 étaient en revanche significativement inférieurs à ce qu'ils étaient dans le groupe 1 (respectivement 14,5 et 12,7 % pour le groupe 2 *versus* 31,6 et 30,3 % dans le groupe 1 ; $p < 0,01$). Après analyse multivariée, l'odds-ratio des fausses couches spontanées (FCS) du premier trimestre de la grossesse était de 3,1 (IC95% : 2,1-4,1 ; $p < 0,01$) dans le groupe 2. Le nombre d'embryons congelés dans le groupe 2, significativement moins important que dans le groupe 1 ($1,2 \pm 0,7$ *versus* $1,8 \pm 0,5$; $p < 0,0001$), accentue la différence de taux cumulés de grossesse évolutive entre les deux groupes.

Notre étude n'a pas observé d'impact du métier sur la survenue d'une cohorte plus importante d'ovocytes avec une CLCG sévère (12 *versus* 17,6 % de métiers jugés à risque dans les groupe 1 et 2, respectivement ; $p > 0,05$). À l'inverse, il existe une différence significative lorsque l'on corrèle le lieu d'habitation des couples à la quantité de substances actives issues des pesticides relevées dans les masses d'eau superficielles. La figure 2 rapporte les différents résultats en fonction des lieux d'habitation, avec une différence significative entre les groupes 1 et 2 dans les zones 1 ($p < 0,001$), 2 ($p < 0,02$) et 4 ($p < 0,05$).

Analyse de la littérature

D'après notre étude, la présence d'une cohorte où plus de 75 % des ovocytes présentent une CLCG sévère est responsable d'une baisse significative du taux de fécondation et de clivage, et d'une multiplication par 3 du nombre de FCS du premier trimestre de la grossesse. Figueira [14] (OR : 1,22 [IC95 % 1,03-1,45] ; $p < 0,05$) et Balaban [11] observent un impact de la granularité cytoplasmique sur

les taux de fécondation, et Ebner [5] un taux de fécondation (58,9 %) et de blastulation (44 %) significativement inférieur ($p < 0,01$). Rienzi [12] note une différence significative de la morphologie des pronuclei selon qu'il existe ou non une CLCG (OR : 2,65 ; IC95% : 1,45-4,85 ; $p : 0,002$), ainsi que de la qualité embryonnaire (OR : 2,26 ; IC95% : 1,25-4,08 ; $p : 0,007$). Balaban [11] et Ten [15] rapporte quant à eux un effet sur la qualité embryonnaire. Ainsi, dans le calcul global du score d'anomalies ovocytaires de Rienzi [12], la présence d'une CLCG est associée au score le plus élevé (2,7), contre 1,4 pour l'élargissement de la zone périvitelline, 2 pour l'anomalie du premier globule polaire et 2,1 pour la présence de vacuoles. À l'inverse, d'autres auteurs ne rapportent pas d'effet de l'existence de CLCG sur les taux de fécondation [16, 17] ou sur la morphologie embryonnaire [4].

L'impact des ovocytes avec CLCG semble être déterminant sur l'implantation embryonnaire et l'évolution de la grossesse. Ainsi, Schmutzler [18] a rapporté des taux de grossesse variables en fonction de la granularité du cytoplasme, et Alikani [16] a montré une augmentation des FCS lorsqu'un cytoplasme granuleux est observé. Otsuki [8] et Ebner [5] constatent également une augmentation des FCS (grossesse biochimique pour Otsuki) en cas de CLCG. Pour Kahraman [10], la baisse de l'implantation et le fort taux de FCS (54,5 %) en cas de CLCG seraient en rapport avec une perturbation des organites cytoplasmiques (réticulum endoplasmique et mitochondries), un stress oxydatif augmenté et une anomalie du fuseau de division. Cet auteur a réalisé une analyse cytogénétique (chromosomes X, Y, 13, 18 et 21) des embryons chez neuf des trente-neuf cycles (trente-trois protocoles longs agoniste de la gonadolibérine [GnRH] et six protocoles courts) présentant plus de 50 % d'ovocytes avec CLCG. Le taux d'aneuploïdie embryonnaire est de 52,2 % en cas d'ovocytes avec CLCG sévère, contre des valeurs de 15 à 20 % généralement admises dans les embryons issus d'ovocytes normaux [2]. Pour Kahraman [10], cette augmentation des aneuploïdies pourrait être due à la prise en charge d'anomalies très sévères de la spermatogenèse et à l'âge avancé des femmes, ce qui n'est pas le cas dans notre étude puisque nous avons exclu les femmes de plus de 35 ans, les oligoasthénospermies sévères et les cas de fragmentation importante de l'ADN des spermatozoïdes.

Dans l'étude d'Otsuki [8], le nombre d'ovocytes avec CLCG était en relation avec le taux d'œstradiolémie le jour du déclenchement (différence significative à $p < 0,05$) mais pas avec le taux de progestérone. Kahraman [10] confirme cette relation avec l'hyperœstradiolémie. Pour Sa [9], l'aspect de CLCG pourrait être la conséquence d'une hyperstimulation ovarienne, car cette anomalie n'a jamais été observée dans les ovocytes aspirés à partir de follicules antraux lors de cycles non stimulés. Ebner [19] a montré une relation entre la présence de CLCG et le taux d'AMH (6,4 % si AMH élevée *versus* 1,7 % en cas d'AMH nor-

male), la dose totale d'hormone folliculostimulante (FSH) ($p < 0,01$) et la durée de la stimulation ($p < 0,001$). Cette hyperœstradiolémie pourrait conduire à une apoptose ovocytaire, d'où l'apparition d'une CLCG et d'une aneuploïdie (18 à 37 %), sans perturbation de l'organisation du fuseau méiotique, pouvant ainsi expliquer l'absence d'anomalie de fécondation et de clivage observée avec ces ovocytes, comme l'a montré Munné [20]. Pour Rienzi [12], le type de protocole utilisé (agoniste, antagoniste ou *mild stimulation*) n'affecte pas le taux d'anomalies ovocytaires, mais il existe une corrélation significative entre le taux d'anomalies et la dose totale de FSH utilisée au cours de la stimulation, et inversement significative avec le nombre d'ovocytes en métaphase II récupérés. Cota [6] ne rapporte pas non plus d'impact des protocoles agoniste ou antagoniste de la GnRH sur les anomalies du cytoplasme ovocytaire (OR : 1,05 ; IC95% : 0,61-1,80), et en particulier en cas de CLCG (OR : 1,06 ; IC95% : 0,48-2,44). Dans notre étude, la proportion de cycles avec agoniste ou antagoniste de la GnRH n'est pas différente dans les deux groupes.

Relation entre la qualité ovocytaire et l'exposition aux pesticides

Notre étude a mis en évidence un risque majoré de FCS chez les femmes présentant une cohorte ovocytaire avec plus de 75 % d'ovocytes avec CLCG, ainsi qu'un lien entre cette évolutivité et l'imprégnation aux pesticides. La carte de la Picardie du GREPP ne permet pas de déterminer quel type de pesticide est utilisé, ni s'il s'agit d'une exposition aiguë ou chronique. Le *tableau 2* et la *figure 3*, issus de l'article de Vabre [21], résument les principaux effets des pesticides et autres polluants chez l'animal et l'espèce humaine, ainsi que leurs mécanismes d'action. On retrouve ces différents produits dans la vie courante :

- les phtalates : plastiques flexibles, emballages alimentaires, poche de perfusion médicale, vernis, parfum d'ambiance, produits d'entretien, etc.,
- les retardateurs de flammes bromés : éthers diphenyliques polybromés dans les textiles et matelas,
- les parabènes : cosmétiques, filtres à ultraviolets, produits solaires, conservateurs alimentaires,
- les dioxines issues des incinérateurs et des cheminées,
- les PCB : contaminants industriels,
- le DDT et le DDE des insecticides et des pesticides,
- le triclosan : dentifrice et produits d'entretien,
- les nonylphénols : détergents à usage domestique et industriel,
- le bisphénol A : emballages alimentaires, revêtement intérieur des cannettes et boîtes de conserve, papier thermique, mastic dentaire etc.

Tableau 2. Effets chez l'animal et dans l'espèce humaine des différents polluants, dont les pesticides (données extraites de Vabre et al. [21])

Pesticides	Méthodes	Résultats
Zana, <i>Endocrinol</i> 2009	Rate, MXC (G)	> méthylation ER β , > ADN méthyltransférase 3b
Park, <i>Env Tox Pharm</i> 2014	Souris, simazine (G)	< poids ovaires, > apoptose CG
El-Sharkawy, <i>Exp Tox Pathol</i> 2014	Rate, MXC \pm propolis (antioxydant)	< poids ovaires, > apoptose F primaires, secondaires et antraux, < statut antioxydant ovaires, > peroxydation lipides
Satar, <i>Eur Rev Med Pharm</i> 2015	Rate, méthylparathion	Altération stroma ovarien, apoptose
Kotil, <i>Exp Tox Pathol</i> 2015	Rate, perméthrine	Noyaux picnotiques, chromatine condensée, mitochondries
Farr, <i>Am J Epidemio</i> 2006	Humain , vie et travail à la campagne États-Unis Q5	> âge médian de la ménopause de 3 à 5 ans selon pesticides
Phtalates	Méthodes	Résultats
Xu, <i>Toxicol Lett</i> 2010	Rate, B(a)P et DEHP	< follicules primordiaux, primaires et secondaires, apoptose CG
Moyer, <i>Reprod Toxicol</i> 2012	Souris, MEHP (G)	< vie reproductive de 1 mois
Li, <i>Env Toxicol Pharm</i> 2012 ; Li, <i>Mol Biol Reprod</i> 2014 ; Li, <i>PLOS</i> 2016	Souris, DEHP Souris, DEHP (G) Souris, DEHP	Apoptose CG Méthylation ovocytes F1 et F2 < follicules antraux, ROS, apoptose
Zhang, <i>Env Mol Mut</i> 2013 ; Zhang, <i>Rep Fert Dev</i> 2015	Souris, DEHP Souris, DEHP (G)	< follicules primordiaux, méthylation < pool folliculaire, méthylation
Hannon, <i>Biol Reprod</i> 2014 ; Hannon, <i>Toxicol Sci</i> 2016	Souris, DEHP Souris, DEHP	< Follicules primordiaux > BAX/BCL2, < Follicules primordiaux
Niemann, <i>Rep Tox</i> 2015	Souris, DEHP (G)	> délai de reproduction de 5 j
Sen, <i>Rep Tox</i> 2015	Souris, DBP	< follicules antraux, apoptose
Messerlian, <i>HR</i> 2016	Humain , phtalate U, CFA	< CFA
Bisphénol A	Méthodes	Résultats
Rodriguez, <i>Rep Tox</i> 2010	Souris, BPA	< follicules primordiaux, prolifération CG
Zhang, <i>Mol Biol Rep</i> 2012	Souris, BPA (G)	< follicules primordiaux, méiose
Li, <i>Rep Tox</i> 2014	Souris, BPA	< poids, < F primordiaux, < F primaires et pré-antraux, apoptose
Berger, <i>Rep Tox</i> 2015	Souris, BPA (G)	< follicules pour F1, altérations géniques

Chez la femme, l'exposition aux pesticides altère la folliculogénèse (via les cellules de la granulosa et de la thèque [22]), induit des aberrations méiotiques (aneuploïdie) et conduit à l'atrésie folliculaire. Le DDT, par exemple, stimule l'aromatase et agit en synergie avec la FSH, entraînant une élévation prématurée de l'œstradiol qui est impliqué dans la maturation ovocytaire. Les ovocytes les plus touchés par un environnement toxique sont ceux qui sont au stade de maturation préméiotique. Ar buckle [23], au Canada, a montré une augmentation des FCS avant douze semaines d'aménorrhée suite à une exposition aux pesticides – ce qui n'a pas été observé dans l'étude de Willis, menée en Californie [24]. Récemment, Al-Hussaini [25]

a étudié, chez quatre-vingt-quatorze femmes égyptiennes de 20 à 38 ans prises en charge en ICSI, l'impact des concentrations dans le liquide folliculaire de pesticides organochlorés (lindane et DDT), d'organophosphates (chlorpyrifos **Q3**, diazinon et malathion), de pyréthroïdes (bioalléthrine et β -cyfluthrine) et de quatre PCB (28, 52, 138 et 180). Il ressort de son étude que tous ces produits agissent négativement sur l'épaisseur endométriale, et que certains ont un effet sur le nombre d'ovocytes recueillis (5/12), leur fécondation et leur clivage (3/12), ou sur les taux d'implantation embryonnaire (5/12).

De plus, issus de certains pesticides, les perturbateurs endocriniens peuvent également agir négativement sur la

Tableau 2. (Suite)

Autres polluants	Résultats
Phyto-œstrogènes	Sénescence de la fonction ovarienne, dysfonction de la folliculogénèse, apoptose des CG, < pouvoir antioxydant, atteinte axe hypothalamohypophysaire
Hydrocarbures polyaromatiques (PAH)	Dysfonction ovarienne (AhR)
Dioxines	Sénescence ovarienne et risque > de ménopause
Polychlorobiphényle (PCB)	< poids ovarien et atrésie folliculaire
Composés perfluorés	< âge de la ménopause
Retardateur de flamme	Altération de la folliculogénèse
Protection UV : 2-hydroxy-4 méthoxybenzène (HMB)	Altération de la folliculogénèse à forte dose
2-bromopropane	Augmentation des IOP

< : diminution ; > : augmentation ; ER : récepteur aux œstrogènes ; F1, F2 : 1^{re} et 2^e génération ; CFA : compte des follicules antraux ; MXC : méthoxychlore ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; DEHP : di(2-éthylhexyl) phtalate ; MEHP : mono(2-éthylhexyl) phtalate, DBP : dibutyl-phtalate ; F : follicule ; CG : cellules de la granulosa ; (G) : durant gestation ; IOP : insuffisance ovarienne prématurée ; AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques

programmation épigénétique des ovocytes, avec des effets au cours de la période intra-utérine (9-20^e semaine) ou durant la vie adulte. Ainsi, du fait de leur persistance à long terme dans les tissus, les pesticides ont été impliqués dans les troubles de l'apprentissage et de l'attention, la survenue d'hypospades et dans certaines obésités durant l'enfance. Dans l'étude d'Otsuki [8], un des enfants a présenté un syndrome de Beckwith-Wiedemann, maladie d'empreinte résultant d'une mutation ou d'un désordre épigénétique affectant le chromosome 11p15.5. Les modifications épigénétiques jouent un rôle important dans la gamétogénèse, via la méthylation de l'ADN ou les ARN messagers qui modifient la séquence d'expression de l'ADN. Ces anomalies pourraient également entraîner des perturbations du signal calcique au sein du cytoplasme, et ainsi être responsables de perturbations de la fécondation, du développement embryonnaire et de l'implantation. Il n'y a pas de publication reliant les ovocytes avec CLCG à des défauts d'empreinte génétique ; il semble cependant nécessaire d'analyser la descendance de ces femmes pour établir s'il y a ou non un lien entre ces anomalies cytoplasmiques et les risques épigénétiques.

Conclusions

La France est le troisième consommateur mondial et le premier en Europe de pesticides, dont on connaît les avantages dans l'agriculture mais dont notre étude montre l'impact sur le cytoplasme ovocytaire et l'évolution des grossesses. L'effet de ces produits sur les gamètes *in utero* n'a pu être recherché en raison de l'absence de données sur le lieu de naissance de ces femmes présentant une forte proportion d'ovocytes avec CLCG. Il nous paraît essentiel

de poursuivre ces travaux sous forme d'études prospectives contrôlées, en tenant compte de la contamination réelle de ces femmes par les pesticides.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- Pocar P, Brevini TA, Fischer B, Gandolfi F. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 2003 ; 125 : 313-25.
- Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 1990 ; 16 : 324-46.
- Veeck LL. Oocyte quality and assisted conception. *Acta Eur Fertil* 1992 ; 23 : 275-88.
- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996 ; 11 : 595-7.
- Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* 2006 ; 12 : 507-12.
- Cota AM, Oliveira JB, Petersen CG, et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in assisted reproduction cycles: oocyte morphology. *Reprod Biol Endocrinol* 2012 ; 10 : 33. doi: 10.1186/1477-7827-10-33.
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997 ; 12 : 1267-70.
- Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 2004 ; 19 : 1591-7.

-
9. Sa R, Cunha M, Silva J, *et al.* Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications. *Fertil Steril* 2011 ; 96 : 143-9.
10. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, *et al.* Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000 ; 15 : 2390-3.
11. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 3431-3.
12. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update* 2010 ; 17 : 34-45.
13. Merviel P, Cabry R, Chardon K, *et al.* Impact of oocytes with CLCC on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure. *J Ovarian Res* 2017 ; 10 : 42.
14. Figueira RC, Braga DP, Semiao-Francisco L, Iaconelli Jr. A, Borges Jr. E. Oocyte yield and dysmorphisms as indicators of biological efficiency in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Fertil (Camb)* 2011 ; 14 : 41-7.
15. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online* 2007 ; 14 : 40-8.
16. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 1995 ; 3 : 283-8.
17. Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli Jr. A, Borges Jr. E. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011 ; 159 : 364-70.
18. Schmutzler AG, Acar-Perk B, Weimer J, *et al.* Oocyte morphology on day 0 correlates with aneuploidy as detected by polar body biopsy and FISH. *Arch Gynecol Obstet* 2014 ; 289 : 445-50.
19. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommerguber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reprod Biomed Online* 2008 ; 16 : 113-8.
20. Munné S, Ary J, Zouves C, *et al.* Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online* 2006 ; 12 : 340-6.
21. Vabre P, Gatimel N, Moreau J, *et al.* Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environ Health* 2017 ; 16 : 37.
22. Marques-Pinto A, Carvalho D. Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocr Connect* 2013 ; 2 : R15-29.
23. Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* 2001 ; 109 : 851-7.
24. Willis WO, de Peyster A, Molgaard CA, Walker C, MacKendrick T. Pregnancy outcome among women exposed to pesticides through work or residence in an agricultural area. *J Occup Med* 1993 ; 35 : 943-9.
25. Al-Hussaini TK, Addelaleem AA, Elnashar I, *et al.* The effect of follicular fluid pesticides and polychlorinated biphenyls concentrations on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryological and clinical outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018 ; 220 : 39-43.

4. **Présentation de l'article intitulé « *Endocrine disruptors and a potential decline in fertility : a case-control study in the Picardy region of northern France* »,**

Article soumis au « Journal Environmental health and preventive médecine » en 09/2018

Introduction - Objectifs

Les PE et leurs effets sur l'axe reproductif sont de plus en plus évoqués comme une des explications de l'augmentation croissante du nombre de couples infertiles. Le but de notre étude est d'évaluer l'exposition des patientes prises en charge en Assistante Médicale à la Procréation (« Cas ») à divers PE, en comparaison à une population fertile de femmes enceintes (« Témoins »).

Matériel et Méthode : Nous avons réalisé une étude cas-témoins, descriptive, unicentrique au Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens de juin à novembre 2016 et analysé les expositions liées au lieu d'habitation, au niveau d'exposition chimique (aérosols, cosmétiques, teintures pour les cheveux, produits ménagers, pesticides, insecticides, herbicides), à l'exposition toxique professionnelle et à l'alimentation (fréquentation de fast-foods, utilisation de plats industriels, alimentation biologique, fruits, légumes et eaux).

Résultats : Nous avons pu réaliser l'analyse des questionnaires de 311 patientes : 102 « Cas » et 209 « Témoins ». Notre étude confirme la surexposition des patientes prises en charge en Assistance Médicale à la Procréation comparée à la population générale sur deux paramètres : l'ancienneté du type d'habitation (58% des cas vs 38% des témoins, $p = 0.0005$) et la réalisation de plus de six teintures de cheveux (58% des cas vs 45% des témoins, $p = 0.033$). La consommation régulière d'eau du robinet est apparue comme un facteur significatif caractérisant la population fertile (29% des cas vs 40% des témoins, $p = 0.00069$).

Conclusion : Cette étude montre l'omniprésence des PE dans notre quotidien et la difficulté d'établir clairement un niveau d'exposition toxique. L'absence de données quant à leurs effets sur le long terme, la méconnaissance de leur existence de la part de la population et le rôle des professionnels de santé sont à souligner.

Environmental Health and Preventive Medicine

Endocrine disruptors and a potential decline in fertility: a case-control study in the Picardy region of northern France

--Manuscript Draft--

Endocrine disruptors and a potential decline in fertility: a case-control study in the Picardy region of northern France.

Rosalie Cabry-Goubet R (1,2), Florence Scheffler F (1,2), Véronique Bach (2) Jessica Noel (1), Emmanuelle Lourdel (1), Naima Belhadri-Mansouri N (1), Aviva Devaux (1,2), Rachelle Desailoud (3), Henri Copin H (1), Moncef Benkhalifa M (1,2).

- 1) Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie, CHU et Faculté de Médecine . université de Picardie jules Vernes Amiens.
- 2) PERITOX. CURS. Université de Picardie jules Vernes Amiens.
- 3) Endocrinologie, maladies métaboliques et nutrition, CHU Amiens.

Correspondence : cabry.rosalie@chu-amiens.fr

ABSTRACT

Background: The impact of endocrine disruptors on the gonadotropin axis and hormone system has been well documented. Endocrine disruptors are thought to be one of the major causes of a putative decline in fertility in couples of child-bearing age. The objective of the present study was to assess the negative effect of exposure to various endocrine disruptors on clinical outcomes for women undergoing assisted reproductive technology (ART) cycles (cases) and in a population of pregnant women (controls) from the same region of northern France.

Methods: This descriptive, single-centre, case-control study was performed at the Amiens University Hospital (Amiens, France) from June to November 2016. We assessed exposures related to the place of residence, various chemicals (aerosols, cosmetics, hair dyes, household products, pesticides, insecticides, and herbicides), the occupation, and food (fast food, processed ready-meals, organic food, fruits, vegetables, and water).

Results: We analysed questionnaires from 311 patients (102 cases and 209 controls). Our results confirmed that women enrolled in an ART programme were more exposed to endocrine disruptors than the general population with regard to two parameters: living in an old house (58% of the cases vs. 38% of the controls; $p=0.0005$), and more than six hair dyes in the lifetime (58% of the cases vs. 45% of the controls; $p=0.033$). Regular consumption of tap water appeared to be a significant characteristic of the sample of pregnant women (29% of the cases vs. 40% of the controls; $p=0.00069$).

Conclusion: Our results showed that endocrine disruptors are omnipresent in our daily lives and emphasize how difficult it is to establish a clear cut-off for toxic exposure levels. The present study highlights the lack of data on endocrine disruptors' long-term effects, the lack of awareness of endocrine disruptors among the general population, and the potential role of healthcare professionals in prevention.

KEYWORDS:

Endocrine disruptors, infertility, assisted reproductive technology, pregnancy, lifestyle, primary prevention.

Background

Endocrine disruptors (EDs) are molecules of natural or artificial origin that interfere with the hormone system's functions and influence the synthesis, secretion, transport, action or elimination of hormones (Table 1). The increasing proportion of couples having difficulties conceiving has prompted EDs to be increasingly scrutinized with regard to a possible pathophysiological role in infertility (1).

Xenoestrogens are considered to be EDs that interfere with the reproductive hormone system; they are exogenous substances that interact with the endogenous hormones of the gonadotropic axis responsible for sexual differentiation and reproduction. Hence, xenoestrogens can therefore have several types of action, such as estrogenic, anti-estrogenic, androgenic, and anti-androgenic mimic activities.

The primary objective of the present study was to investigate the putative negative impact of ED exposure on clinical outcomes in women enrolled in an assisted reproductive technology (ART) programme (cases) and in women having spontaneously conceived in less than 12 months (controls). The second objectives were to analyse the exposure to toxics of women of childbearing age in the Picardy region of France and to implement a primary prevention programme.

MATERIALS AND METHODS

We carried out a descriptive, single-centre case-control study at the ART clinic at Amiens University Hospital (Amiens, France) from June to November 2016. The Picardy region is one of France's major agricultural region, and pesticide use is heavy. The study comprised two groups of women:

- A case group (Group 1, G1): women between 18 and 42 years of age, consulting for infertility, and undergoing to ART programme after 12 months of failure to conceive naturally. The main exclusion criteria were a history of chemotherapy or radiotherapy (due to destruction of the ovarian reserve and thus a proven decline in fertility), and the counter-indication to ART for viral reasons (infection with HIV, hepatitis B or hepatitis C).

- A control group (Group 2, G2): pregnant women between 18 and 42 years of age,

consulting in the obstetric department at Amiens University Hospital. The current pregnancy had to be spontaneous and obtained in less 12 months without contraception.

The study questionnaire included questions on general parameters (age, body mass index (BMI), infertility, and desire to conceive) and any history of first-trimester miscarriages and ectopic pregnancies. We evaluated exposure levels related to accommodation (the current place of residence, the place of residence during childhood, the age and type of house or building, the mode of heating, the distance from the nearest industrial zone, factory, landfill site, motorway, airport and intensively farmed agricultural area), the cumulative time spent in farmer zone per year, and an assessment of the level of exposure to chemicals (aerosols, cosmetics, hair dyes, household products, pesticides, insecticides, and herbicides), occupational exposure to toxics, and dietary exposure (consumption of fast foods, processed ready meals, organic food, fruits, vegetables, and water).

We used Excel 2007 software (version 12.0, Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) for data collection, statistical interpretation and graphing. Statistical analyses of the results were based on a chi² exact test. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS

We collected 119 questionnaires from the case group (102 of which were complete) and 256 questionnaires from the control group (209 of which were complete). The two groups differed significantly with regard to age but not BMI, miscarriages and ectopic pregnancies (Table 2). The mean duration of infertility was 2.5 years for cases and 5.5 months for controls. The average term of pregnancy was 27 weeks of amenorrhea in the control group.

Impact of the place of residence

There was no intergroup difference in the place of residence (city centre vs. suburbs vs. village or hamlet) in childhood or at the time of the study (Table 3). However, there was a significant difference in the type of dwelling: 43% of the cases and 31% of the controls lived in an old house ($p=0.04$), and 15% of the cases and 7% of the controls lived in an old apartment ($p=0.038$). In total, 58% of the cases and 38% of the controls lived in old housing (a house or an apartment; $p=0.0005$; Table 3).

There were no significant intergroup differences in terms of the heating mode (electricity vs. gas vs. stove or chimney vs. fuel oil) (Table 3) or the distance between the household and the nearest motorway, airport, industrial zone, factory, landfill site or agricultural area (Table 3).

With regard to the total time per year spent in the countryside, 22% of the cases spent less than 1 month (vs. 28% of the controls), 7% spent between 1 and 2 months (vs. 11% of the controls), 4% spent between 3 and 4 months (vs. 4% of the controls) and 68% spent more than 4 months (vs. 56% of the controls). None of these differences were significant (Table 3).

Impact of lifestyle

The everyday use of cosmetics was similar in the two study groups: 81 of the cases (79%) used cosmetics such as nail polish, solvents, perfumes, hair straighteners and lipsticks daily, vs. 158 of the controls (76%) (Table 4). The case-control difference was significant for hair dyes, depending on the number of events: 58% of the cases had dyed their hair more than 6 times in their lifetime, vs. 45% of pregnant women ($p=0.033$).

Regarding the use of detergents, disinfectants and cleaning products: 55 cases (54%) and 117 controls (56%) used these products at least 3 times a week (difference: NS). Bleach was also used to a similar extent by the two groups: 26 cases (25%) vs. 166 controls (79%) used bleach at least 3 times per week. 64% of cases vs. 66% of controls used deodorants for toilets or for indoor use. The frequency of daily airing of the household (at least 20 min per day) was similar in the two groups: 89% of patients and 88% of controls (NS).

There was no significant intergroup difference with regard to the daily use of aerosols (i.e. sprays with a propellant) in general (59% of the cases vs. 53% of controls) or deodorant-type aerosols and aerosols for household products and food products in particular (Table 4). Lastly, 9% of the cases and 7% of the controls regularly used insecticides or herbicides (NS) (Table 4).

Impact of occupation

Regular occupational handling of various toxic products was reported by 29 cases (28%) and 43 controls (21%), this difference was not significant.

There were no significant intergroup differences in the duration of exposure (less than one year, 2 to 4 years, 5 to 6 years, 7 to 10 years, and 11 years and more) (Table 5) or the means of protection used (gloves, masks, and coveralls).

Impact of food habits and the type of water consumed

We also analyzed food habits in our two populations, i.e. the consumption of fast food, processed ready meals, and organic food. There were no significant intergroup differences in these criteria (Table 6).

Similarly, there were no significant intergroup differences in the consumption of fruits and vegetables considered to be "at risk" because of high residual levels of pesticides (apples, pears, strawberries, grapes, lettuce, peppers and celery; Table 6).

With regard to everyday water consumption: 20 of the 70 of the cases (29%) drank tap water vs. 81 of the 201 controls (40%; $p=0.00069$). Daily consumption of bottled water did not differ significantly when comparing the two groups (Table 7).

DISCUSSION

Place of residence and the type/age of housing

We did not find any significant intergroup differences with regard to the place of residence (city centre vs. suburbs vs. village or hamlet) or the proximity to a farmed area. In Jégou et al.'s study of links between fertility and the environment, the incidence of cryptorchidism, hypospadias and testicular cancer (all of which induce sperm anomalies) was found to be associated with the couples' place of residence (2) and Oligo-asthenoteratospermia in male infertility. According to the French public health monitoring body (3), the regions of France with highest rates of infertility are Aquitaine, Bourgogne and Rhône-Alpes, where mainly wine is produced.

The type of dwelling is also an important environmental parameter. According to recent studies by the French National Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, domestic indoor air is 5 to 10 times more polluted than the outside air (5). The main indoor pollutants are related to furniture (chipboard furniture, new furniture and varnish), building materials (asbestos, lead, paints, glass wool, and solvents) and various commonly used chemicals (scented candles, incense, indoor fragrances, household products, etc.) (5).

According to a study by Menard et al (6), 84% of the population regularly air their home; this figure was confirmed by the present study.

The heating mode (and thus the risks related to carbon monoxide) may also have a significant impact on fertility potential declining risks. However, our results did not reveal any significant intergroup differences with regard to this criterion. Most of the participants had electric or gas heating only.

The impact of the type of dwelling (house vs. apartment, new vs. old, etc.) on fertility has not previously been studied. In 2013, the French National Institute of Statistics and Economic Studies (INSEE) published a report on housing conditions in metropolitan France (7, 8). It was noted that 10% of dwellings have three or more faults. Our present results highlighted a significant difference in relation to this criterion: most of the cases lived in an apartment ($p=0.0382$ vs. controls) or an old house ($p=0.040$ vs. controls).

Use of household products and cosmetics

According to the Women Engage for a Common Future initiative (9) and the Association for Health and the Environment in France (10), several toxics may be found in household products. The main ones are phthalates, ether glycols and formaldehyde. Phthalates in particular might impair human reproductive functions (11), along with their irritant, allergenic and carcinogenic effects. Our study did not reveal a significant case vs. control difference in the use of these products, which were widely used in both groups. Today's concerns need to be addressed by further studies of the various types of household products and their components.

Unlike drugs, cosmetics do not require market authorization by the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products. It is up to the manufacturer to ensure that their products meet legislative and regulatory requirements and are not dangerous to health (12). The main EDs present in cosmetics are parabens, whereas sunscreens contain benzophenone, perfumes, formaldehyde, and phenoxyethanols. Endocrine disruptors are also found in shampoos, toothpastes, perfumes, creams, sun products, deodorants, makeup, nail polish, and hair dyes (13). Phthalates are known to be reprotoxic substances, and were used in nail polish before being banned in Europe. However, cosmetics purchased abroad or on the Internet may contain phthalates (14). According to a study by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) published in 2011 (15), methyl- and propylparaben were found in almost 90% of urine samples in the general population, with

significantly higher concentrations in samples from adolescent and adult females. Nearly 80% of cosmetics (shampoos, creams, shaving creams, etc.) contain parabens as preservatives.

Hair dyes are regularly identified as allergens, carcinogens and disruptors of the hormonal system (16). We found that 58% of the cases and 53% for controls had already had their hair dyed four times in their lifetime. There was a significant intergroup difference when considering the proportion of women having had hair dyed six times ($p=0.0027$). In view of the allergic symptoms linked to the use of dye products, the French government drew up (in 2001) a list of substances that are prohibited in cosmetics (16). Boric acid, thioglycolic acid and ammonia are some of the main banned components. However, paraphenylenediamine is prohibited in cosmetics but is still allowed in hair dyes (17). Although resorcinol is used in most hair colourants, the compound's effects are poorly understood.

Occupational exposure to toxic substances is tightly regulated and is closely monitored by occupational physicians working for the French health insurance system (18). The various occupational risks for groups of professions were listed by the SUMER study and updated in 2003 by Arnaudo et al. (19). According to the SUMER study, 38% of employees reported having been exposed to at least one chemical product in the course of their professional activity. In our population of women seeking to join an ART programme, 28% reported having an occupation that is considered to involve exposure to toxic substances (vs. 21% of controls).

According to the French Ministry of Social Affairs and Health (20), the employees most strongly exposed to toxics on a regular basis are those in the agricultural sector and the pharmaceutical and chemical industries. The protection of employees is regulated by the French Labour Code and monitored annually by occupational physicians, who ensure its proper application.

Food and water

According to a 2012 study by the INSERM (21), bisphenol A and phthalates (mainly diisononyl phthalate, di-2-ethyl hexyl phthalate, and dibutyl phthalate) can be found in food and especially in food packaging. Film-wrapped ready meals are most affected but heating in the microwave oven causes the deposition of these compounds within the food itself (22). According to the French National Establishment for Agriculture and Sea Products (23), 4% of French households' food budget is spent on cooked dishes, pizzas, quiches and pies.

According to the INSEE (24), French people spend less time preparing their meals than before - thus exposing themselves to products associated with health risks (i.e. processed ready meals, frozen products, and fast food).

The French Association for Health and the Environment (25) states that the dishes sold by fast food restaurants (kebabs, hamburgers, pizzas, etc.) are often packaged in films containing diisononyl-phthalate, which increases the concentration of phthalates in these foods.

The bioaccumulation property of EDs in adipose tissue prompts one to question the diet consumed by the cases in the present study had eaten. The onset of infertility may be a long-term consequence of the bioaccumulation of these EDs in the woman's adipose tissue. A retrospective study of these patients' eating habits should be implemented.

Some fruits (such as grapes or apples) are more frequently treated with pesticides because they are considered to be more fragile by producers. However, the French government sets a maximum residue level (MRL) for pesticides in fruits and vegetables. According to a 2014 report by the French National Agency for Food and Environmental Safety (26), some samples showed a toxic risk (i.e. over the MRL). Imported products were particularly affected; certain pesticides found in imported products are not allowed in Europe. For example, 62% of fruit samples (especially apples, pears, grapes, and strawberries) and 30% of vegetables (peppers, lettuce, carrots, and celery) have pesticide residues (26). According to the French Ministry of Agriculture (27),

According to the French National Institute for Research in Science and Technology for the Environment and Agriculture) (29), a large number of EDs (cancer drugs, paracetamol, contraceptive pills, menopause therapies, veterinary medications, etc.) in wastewater residues because treatment plants are not designed to fully remove these compounds (30). This suggests to us that by drinking tap water, the residual, untreated PEs will be consumed by the general population. According to the water information centre (31), 65% of French people drink tap water daily.

In view of various reports on the presence of phthalates and bisphenol A in bottle plastic components (32), the French National Federation of Packaged and Bottled Waters) (33), published a 2013 study on the presence or absence of emerging pollutants in the bottles of more than 40 brands of mineral water. The Federation claimed that the polyethylene plastic

water bottles used by its members are inert and do not allow the migration of chemicals into the bottled water. This has been confirmed by a University of Bordeaux/CNRS joint research unit, which did not find any phthalates or bisphenol A in more than 130,000 samples of bottled water.

Endocrine disruptors and female infertility

Endocrine disruptors are increasingly being cited with regard to the pathophysiology of infertility (1). By interfering with the reproductive hormone system, they act during "critical" periods of conception, pregnancy and puberty. The EDs' putative effects on infertility are, however, less well documented (34). Evidence of a transgenerational effect has been observed in animal models (35, 36, 37).

In humans, many studies suggest that EDs are involved in the pathogenesis of premature ovarian failure, which is considered to be idiopathic in 75% of patients (38, 39). Phthalates (40), bisphenol A (41), pesticides (42, 43) and tobacco (44,45) are most frequently incriminated with regard to alterations in ovarian function. In mechanistic terms, the acceleration of pre-antral follicular atresia may lead to premature ovarian failure (38). Endocrine disruptors may also have a role in the pathogenesis of ovarian cancer, early puberty, and endometriosis (38).

Poly cystic ovary syndrome (PCOS) is also observed in many infertile women because the condition prevents ovulation. The aetiology of PCOS has yet to be characterized. It's possible that exposure to industrial EDs might favour the appearance or aggravation of POS (46).

CONCLUSION

The objective of the present study was to analyse exposure to EDs among infertile women (cases) and pregnant women from the general population (controls). Our results confirmed that cases were more likely than controls to (i) live in old accommodation, (ii) have dyed their hair more than six times during their lifetime, and (iii) drink tap water on a daily basis.

The present study highlights (i) the fact that EDs are omnipresent our daily lives, (ii) the lack of data on EDs' long-term effects, and (ii) the lack of awareness among the general population. Health professionals and public services have a frontline role in informing at-

risk populations (including children, pregnant women and also infertile couples) about the risks associated with EDs (38).

Reducing exposure to EDs involves simple everyday actions: airing rooms, wearing gloves when using household products, limiting the use of perfumes, indoor air fresheners, paraben- and phthalate-containing cosmetics and hair dyes, and eating a varied diet (notably including organically produced fruits and vegetables).

REFERENCES

1. Endocrine disruption: Fact or urban legend? Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. *Toxicology Letters*. 2013. 223: 295-305.
2. Jégou B. Fertilité et environnement_INSERTM.pdf _ Conférence du 22/10/2008. Société et science.
3. Guide du Gouvernement Français sur la pollution en partenariat avec l'Institut de Veille Sanitaire, l'Agence Nationale de l'Habitat, l'Agence de l'Environnement et de la maîtrise de l'énergie, l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail et le Centre Scientifique et Technique du Batiment .pdf. [cité 26 févr 2017]. Disponible sur: http://www.prevention-maison.fr/pollution/pdf/guide_pollution.pdf
4. Ministère de la santé. Inpes - Prévention Maison / Pollution de l'air intérieur. F. Bourdillon [cité 26 févr 2017]. Disponible sur : <http://www.prevention-maison.fr/pollution/accessible/maison/salon/armoire>
5. Santé Environnement | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. [cité 26 févr 2017]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/thematique/sant%C3%A9-environnement>
6. Ménard C, Girard D, Léon C, Beck F. Baromètre santé environnement 2007 - Pollution de l'air intérieur dans l'habitat. INPES [cité 26 févr 2017]. pdf. Disponible sur: http://inpes.santepubliquefrance.fr/Barometres/BSE2007/pdf/pollution_airint.pdf
7. Arnault S, Crusson L, Donzeau N, Rougerie C. INSEE. Les conditions de logement fin 2013 [cité 12 mars 2017]. N° 1546. 28-04-2015.
8. Derbez M, Wyart G, Douchin F, Lucas JP, Ramalho O, Riberon J, Kirchner S, Mandin C. CSTB. Programme d'études et de recherche de l'Observatoire de la qualité de l'air intérieur. [cité 26 févr 2017]. Rapport CSTB-OQAI/2015-012

9. Guide WECF produits ménagers. Women in Europe for a Common Future. pdf. [cité 1 mars 2017]. Disponible sur : http://www.projetnesting.fr/IMG/pdf/Guide_produit_menagers.pdf
10. Ferrer L. Association Santé Environnement France - Produits ménagers. [cité 1 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.asef-asso.fr/vie-quotidienne/l-actu-de-nos-maisons/2724-avril-2016-produits-menagers-l-odeur-de-propre-mise-en-question>
11. INSERM. Phtalates, soupçons supplémentaires sur une baisse de la fertilité humaine. 2012 [cité 1 mars 2017]. 2014 Mar-Apr;20(2):231-49
12. RAPPORT ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Les produits cosmétiques. [cité 1 mars 2017]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Produits-cosmetiques>
13. Guide WECF produits cosmétiques. Women in Europe for a Common Future. 2016. pdf. [cité 1 mars 2017]. Disponible sur : <http://www.projetnesting.fr/IMG/pdf/guidedefemmeenceinte-web-12-2016.pdf>
14. Cailliez H, THESE sous la direction du Docteur Véronique Bach. Les Perturbateurs Endocriniens : L'exemple dans les produits cosmétiques. [Bibliothèque Universitaire de Santé, Amiens]; 2013.
15. Adamo C, Antignac JP, Auger J, Balaguer P, Burchis D, Bujan L, Chevrier C, Cotinot C, Cravedi JP, Laudet V, Livera G, Slama R, groupe d'experts de l'INSERM. "Reproduction et environnement" [cité 4 mars 2017]. Edition 2011. Livre p 12, 19, 36-40. ISBN 978-2-85598-891-8
16. Arrêté du 6 février 2001 fixant la liste des substances qui ne peuvent être utilisées dans les produits cosmétiques. Legifrance. [cité 4 mars 2017]. NOR: MESP0120407A
17. Maherou J et al. Association Santé Environnement France [cité 4 mars 2017]. Tatouage au henné noir. Disponible sur: <http://www.asef-asso.fr/ma-beaute/l-actu-bien-etre/1365-tatouage-au-henne-noir>
18. ASSURANCE MALADIE. Risques professionnels Carsat Alsace Moselle. Dossier ACD - CMR (Agents chimiques dangereux - Cancérogène, mutagènes, reprotoxiques) - Conduite à tenir. 2012 [cité 18 déc 2016]. Disponible sur: <http://www.carsat-alsacemoselle.fr/dossier-acd-cmr-agents-chimiques-dangereux-cancerogene-mutagenes-reprotoxiques-conduite-tenir>
19. François A, Ha C, Waltisperger D, François S, Fanello S, Roquelaure Y. Etude SUMER 2003. Les expositions aux risques professionnels [cité 4 mars 2017]. 2011; 333-40
20. Ministère des Affaires sociales et de la Santé. Perturbateurs endocriniens. 2015 [cité 4 mars 2017]. Direction général de la santé.
21. Phtalates - INSERM. [cité 4 mars 2017]. pdf. Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/?sequence=44>

22. Guide WECF Alimentation. Women in Europe for a Common Future. 2016. pdf. [cité 5 mars 2017]. Disponible sur : <http://www.asef-asso.fr/attachments/article/1894/petitguidesantealimentation2016web.pdf>
23. FranceAgriMer – Établissement national des produits de l’agriculture et de la mer. RAPPORT de fév 2014. Les achats de plats préparés par les ménages français. [cité 5 mars 2017].
24. Besson D et al. INSEE N° 1208. Le repas depuis 45 ans : moins de produits frais, plus de plats préparés. 1 sept 2008 [cité 5 mars 2017].
25. Association Santé Environnement France - Manger fast-food. [cité 5 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.asef-asso.fr/mon-alimentation/l-actu-alimentation/2736-manger-du-fast-food>
26. Avis de l'Anses. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire lié aux résidus de pesticides. Saisine n°2013- SA-0138.
27. Ministère de l’agriculture. Qui sont vraiment les consommateurs bio ? | Alim’agri. 2011 [cité 6 mars 2017]. Disponible sur: <http://agriculture.gouv.fr/qui-sont-vraiment-les-consommateurs-bio>
28. Ministère de l’économie de l’industrie et du numérique. Les produits biologiques. Décembre 2013. [cité 6 mars 2017]. Disponible sur: http://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgcrf/documentation/publications/depliants/dep_produits_bio19dec2013.pdf
29. Laboratoire de chimie des milieux aquatiques | Irstea. [cité 4 mars 2017]. Laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA). 2014
30. Jobert M, Veillerette F. "Perturbateurs endocriniens / La menace invisible". 2015. *Livre*. (Dans le vif). p 17 à 23, p 35 à 37, p 40, p 46 à 48, p 51 à 53, p 65 à 67, p 101 à 112. ISBN : 978-2-283-02817-9.
31. Centre d’information sur l’eau - Eau et eau du robinet. [cité 4 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.cieau.com/chiffres-du-barometre-tns-sofres-cieau/barometre/10-65-des-francais-boivent-chaque-jour-de-l-eau-du-robinet>
32. L’eau en bouteille est-elle dangereuse/ Dangers Alimentaires. [cité 5 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.dangersalimentaires.com/2011/02/leau-en-bouteille-est-elle-dangereuse/>
33. Eau minérale - CNRS et université de Bordeaux. [cité 5 mars 2017]. Disponible sur: https://eaumineralnaturelle.fr/wp-content/uploads/2014/09/150921_CP_10-VF.pdf
34. Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, A Flows J. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J Endocrinol* 2017; 233; R109-R129.
35. Quesada-Calderón S, Bacigalupe LD, Toro-Vélez AF, Madera-Parra CA, Peña-Varón MR, Cárdenas-Henao H. The multigenerational effects of water

- contamination and endocrine disrupting chemicals on the fitness of *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol*. 2017 Jul 12; 7(16): 6519-6526.
36. Cha S, Baek JW, Ji HJ, Choi JH, Kim C, Lee MY, Hwang YJ, Yang E, Lee SH, Jung HI, Cheon YP. Disturbing Effects of Chronic Low-dose 4-Nonylphenol exposing on Gonadal Weight and Reproductive Outcome over One-generation. *Dev Reprod*. 2017 Jun; 21 (2):121-130.
 37. Brieno-Enriquez MA, Garcia-Lopez J, Cardenas DB, Guibert S, Cleroux E, Ded L, de Dios Hourcade J, Peknicova J, Weber M, del Mazo J. Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of micro RNAs in primordial germ cells. *Plos One* 2015: 21.
 38. Carre J, Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Leandri R. Does air pollution play a role in infertility? a systematic review. *Environnemental health* 2017.16:82.
 39. Grindler N, Allsworth J, Macones G, Kannan K, Roehl K, Cooper A. Persistent organic pollutants and early menopause in US women. *Plos one* 2015; 28.
 40. Messerlian C, Souter I, Gaskins AJ, Williams PL, Ford JB, Chiu YH. Urinary phthalate metabolites and ovarian reserve among women seeking infertility care. *Hum Reprod* 2016;31: 75-83.
 41. Farr SL, Cai J, Savitz DA, Sandler DP, Hoppin JA, Cooper GS. Pesticide exposure and timing of menopause : The agricultural health study. *Am J Epidemiol* 2006 ; 163 : 731-42.
 42. Knox SS, Jackson T, Javins B, Frisbee SJ, Shankar A, Ducatman AM. Implications of early menopause in women exposed to perfluorocarbons. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1747-53.
 43. Taylor KW, Hoffman K, Thayer KA, Daniels JL. Polyfluoroalkyl chemicals and menopause among women 20-65 years of age (NHANES). *Environ health Perspect* 2014; 122: 145-50.
 44. Chang SH, Kim CS, Lee KS, Kim H, Yim SV, Lim YJ. Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause. *Maturitas* 2007; 58: 19-30.
 45. Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss ML, Levin B. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod* 2007; 22: 1175-85.
 46. Paliououra E, Diamanti-Kandarakis E. Industrial endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2013; 36 (11): 1105-11.

TABLES

Name	Molecules/uses	Presence in everyday products	Effects on the body
Bisphenol A	A synthetic oestrogen	Tickets, cans of food, beverage cans, hard plastics, (<i>prohibited in baby's bottles in France since 2011</i>)	Behavioural and reproductive system disorders, hormone-dependant cancers
Dioxins	Produced by combustion (notably by burning household waste, forest fires, industrial sources, etc.)	Meat, fish and milk, including breast milk (via accumulation in adipose tissue)	Congenital malformations, foetal toxicity, altered development in childhood.
Perfluorinated compounds	Water repellents	Kitchen utensils, Teflon, body creams, food packaging, paints, tap water	Low birth weight, oestrogen mimic effects, and interaction with the thyroid gland.
Heavy metals	Lead Cadmium Mercury	Food, water, cosmetics, tobacco, colorants, fertilizers	Intra-uterine growth retard for the foetus, mental handicap for the child, sexual dysfunction
Parabens	Antibacterial and antifungal products (often synthetic oestrogens). Used as preservatives in cosmetics.	Shampoos, shaving foams, household products, moisturising creams, pharmaceuticals, foods.	Reproductive dysfunction.
Phthalates	Plasticisers, including polyvinyl chloride	Balloons, cosmetics, perfumes, tablecloths, shower curtains, lubricants, glues.	May have an effect on the development of the foetus and the newborn, and on fertility.
Triclosan	Antibacterial and antifungal products	Tooth pastes, deodorants, bedding, rubbish bags, tap water	May block oestrogen production
Polybrominated biphenyls and polychlorinated biphenyls	Flame retardants, insulators	Microwave ovens, water, paint, food	Accumulation in the environment, general toxicity

Table 1: Characteristics of the main synthetic EDs

	Infertile women		Pregnant women	p
	Cases	Controls		
	n=102 (%)	n=209 (%)		
Age (years)				< 0.00001
18 – 25	9 (9)	49 (23)		-
26 – 34	53 (52)	130 (62)		-
35 – 39	31 (30)	24 (11)		-
40 – 42	9 (9)	6 (3)		-
BMI (kg/m²)				NS
< 18.5	17 (17)	38 (18)		-
18.5 – 24	36 (35)	85 (41)		-
25 – 29	19 (19)	44 (21)		-
30 – 40	28 (27)	39 (19)		-
> 40	2 (2)	3 (1)		-
SMs	30 (29)	46 (22)		NS
1	19	31		-
2	6	11		-
3	4	3		-
>3	1	1		-
EPs	5 (5)	9 (4)		NS
1	4	8		-
2	0	0		-
3	1	1		-
>3	0	0		-

NS: not significant; SMs: spontaneous miscarriages; EPs: ectopic pregnancies;

Table 2: General characteristics of the two groups of participants (cases and controls)

	Infertile women	Pregnant women	
	Cases	Controls	p
	n=102 (%)	n=209 (%)	
Place of residence during childhood			NS
City centre	18 (18)	57 (27)	-
Suburbs	23 (23)	37 (18)	-
Village or hamlet	61 (60)	115 (55)	-
Current place of residence			NS
Close to a motorway or airport	17 (17)	44 (21)	NS
Distance to the nearest industrial zone, factory or landfill			NS
Less than 1 km	2 (2)	15 (7)	-
1 – km	15 (15)	25 (12)	-
More than 2 km	85 (83)	169 (81)	-
Distance to the nearest field			NS
< 30 m	21 (21)	48 (23)	-
30 – 60 m	16 (16)	29 (14)	-
61 m – 1 km	28 (27)	43 (21)	-
1.1 – 3 km	19 (19)	46 (22)	-
More than 3 km	18 (18)	43 (21)	-

Table 3: Characteristics of the place of residence in cases vs. controls

	Infertile women	Pregnant women	p
	Cases	Controls	
	n=102 (%)	n=209 (%)	
Cosmetics	81 (79)	158 (76)	NS
Detergents (at least 3 times a week)	55 (54)	117 (56)	NS
Bleach (at least 3 times a week)	26 (25)	43 (21)	NS
Deodorants for toilets or indoors	65 (64)	138 (66)	NS
Hair dyes (lifetime)	-	-	0.0027
None	23 (23)	32 (15)	NS
1 – 2	11 (11)	36 (17)	NS
3 – 4	9 (9)	30 (14)	NS
5 – 6	0 (0)	17 (8)	0.003
> 6	59 (58)	94 (45)	0.033
Airing rooms for at least 20 min a day	91 (89)	183 (88)	NS
Use of pesticides in the garden	9 (9)	15 (7)	NS

Table 4: Exposure to chemicals in cases vs. controls

	Infertile women		Pregnant women	p
	Cases	Controls		
	n=29 (%)	n=43 (%)		
Duration of exposure				NS
More than 10 years	7 (24)	7 (16)		-
7 – 10 years	8 (28)	14 (33)		-
5 – 6 years	7 (24)	8 (19)		-
1 – 4 years	5 (17)	13 (30)		-
Less than 1 year	2 (7)	1 (2)		-
Use of protective clothing				NS

Table 5: The duration of occupational exposure to toxics in cases and controls

	Infertile women		Pregnant women	p
	Cases	Controls		
	n=102 (%)	n=209 (%)		
Fast food**	22 (22)	53 (25)		NS
Ready meals**	18 (18)	34 (16)		NS
Organic food*	6 (6)	20 (10)		NS
At-risk fruits*	48 (47)	124 (59)		NS
At-risk vegetables*	56 (55)	46 (45)		NS

*Daily

Table 6: Food habits in cases and controls

	Infertile women	Pregnant women	
	Cases	Controls	p
	n=70 (%)	n=201 (%)	
Tap water	20 (29)	81 (40)	0.00069
Bottled water	50 (71)	118 (59)	NS

Table 7: Water consumption (daily) in cases and controls

Abbreviations

Assisted Reproductive Technology: ART

Endocrine Disruptors : EDs

Acknowledgements

We would like to thank the collaborating staff of our IVF centre and Peritox research team

Availability of data and material

The datasets generated are from the corresponding author

Authors contributions

RC, AD, MB: design, analysis, interpretation of the data and manuscript preparation

F S, VB, J N, EL, NB, RD, HC: revising the article for intellectual content

All authors read and approved the final manuscript

Ethics approval

This study was approved by the university Hospital under Trial registration: TabacFertimas ID number: ID2011-A00634-37 registered 2011/2/8

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest

5. Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « Résultats des analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes prises en charge en FIV +/- ICSI en fonction de leur statut tabagique ».

Etude réalisée dans le cadre de mon mémoire de Master 2 en 2010

Introduction – Objectifs

Les dosages sanguins de nicotine et de cotinine peuvent être déterminés afin d'apprécier l'exposition tabagique. L'objectif principal de notre étude est de réaliser la mise au point de ces dosages dans les liquides folliculaires de patientes prises en charge en FIV +/- ICSI. Les objectifs secondaires sont de déterminer s'il existe une corrélation entre ces dosages et le statut tabagique de la patiente, leur réserve ovarienne et les différents paramètres de l'AMP.

Matériel et Méthode

Les dosages de nicotine et de cotinine ont été obtenus par technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Ils ont été corrélés aux différents paramètres de l'AMP obtenus chez ces patientes (chi-2, modèles de régression linéaire).

Résultats

Les liquides folliculaires de 15 patientes (9 non fumeuses et 6 fumeuses) ont été analysés. Il a été retrouvé :

- Une corrélation significative de ces dosages au tabagisme des patientes ainsi qu'aux dosages de CO dans l'air expiré de celles-ci,
- Un dosage de cotinine dans les liquides folliculaires plus corrélé au nombre de cigarettes fumées par jour et aux dosages de CO dans l'air expiré que celui de la nicotine
- Une absence de corrélation significative entre ces dosages et les taux de FSH de base des patientes ainsi que les autres paramètres de l'AMP

Discussion

La présence de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes non fumeuses pose la question d'un éventuel tabagisme passif, qui ne peut être dépisté par le dosage de CO dans l'air expiré.

Conclusion

Les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires sont possibles. Ils sont le reflet du tabagisme actif et passif des patientes.

Présentation des résultats d'une étude préliminaire intitulée « Résultats des analyses préliminaires de mise au point des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes prises en charge en FIV+/- ICSI en fonction de leur statut tabagique »,

Etude réalisée dans le cadre de mon mémoire de Master 2 en 2010

Les résultats présentés concernent les prélèvements réalisés chez 15 patientes : 9 patientes non fumeuses (Groupe NF = Non Fumeuses) et 6 patientes fumeuses (Groupe F = Fumeuses) et ont été obtenus dans le cadre des analyses préliminaires à la mise en place du PHRC.

A . Etude de la comparabilité des groupes

L'étude des données quantitatives (âge des patientes, durée d'infertilité, rang de la demande, rang de la ponction) et qualitative (type d'infertilité) a permis d'objectiver l'absence de données significativement différente et de prouver la comparabilité des groupes.

Tableau 6 : Etude de la comparabilité des groupes

	Age des patientes	Durée Infertilité	Rang de la demande	Rang de la ponction	Type d'infertilité
NF 01	36	6	1	3	primaire
NF 02	25	2	1	2	primaire
NF 03	30	3	1	1	primaire
NF 04	26	2	1	2	primaire
NF 05	29	3	1	4	primaire
NF06	36	2	2	2	secondaire
NF08	28	3	1	1	primaire
NF09	23	4	1	1	primaire
NF10	24	2	1	2	primaire
Moyenne NF	28.55	3	1.11	2	
F 01	26	2	1	2	primaire
F 02	31	3	1	1	primaire
F03	32	3	2	1	secondaire
F04	32	2	1	2	primaire
F05	33	2	1	2	primaire
F06	37	6	2	3	secondaire
Moyenne F	31.83	3	1.33	1.83	
p	0.2<p<0.1	-	0.3<p<0.2	0.2<p<0.1	0.9<p<0.95

B. Corrélation des taux de nicotine et de cotinine dans les LF au tabagisme des patientes

Les taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires en fonction de l'exposition tabagique des patientes sont présentés dans le tableau 7 (*Tableau 7 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et exposition tabagique des patientes*).

Il a été retrouvé des taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires supérieurs au seuil de quantification chez toutes les patientes fumeuses. L'étude de régression linéaire retrouve un lien significatif ($p < 0.01$) entre le dosage du taux de nicotine (Figure 6) et de cotinine (Figure 7) dans les liquides folliculaires et le nombre de cigarettes fumées par jour par les patientes.

Il a également été retrouvé des taux de nicotine supérieur au seuil de quantification dans les liquides folliculaires de 4 patientes non fumeuses et des taux de cotinine supérieur au seuil de quantification dans les liquides folliculaires de 7 patientes non fumeuses, posant la question d'un éventuel tabagisme passif.

Dans un premier temps nous avons essayé de déterminer s'il existait un lien entre la détection de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires des patientes non fumeuses et le statut tabagique de leur conjoint (patientes fumeuses passives). Seuls les conjoints des patientes NF02, NF03 et NF09 sont fumeurs, respectivement de 20, 15 et 10 cigarettes par jour chacun. Nous pouvons remarquer que quand l'homme est fumeur, le dosage de cotinine dans le liquide folliculaire des patientes est toujours positif.

Dans un second temps nous avons essayé de déterminer s'il existait un lien entre la présence de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires des patientes non fumeuses et le fait qu'elles aient été d'anciennes fumeuses. Seule la patiente NF04 est une ancienne fumeuse (fumeuse de 10 cigarettes/jour, tabagisme sevré depuis 5 ans). Chez cette patiente le dosage de nicotine dans le liquide folliculaire est nul et le dosage de cotinine dans le liquide folliculaire est de 0.2 ng/ml. L'hypothèse selon laquelle la présence de nicotine ou de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes non fumeuses serait liée à leur ancien statut tabagique ne paraît donc pas la plus probable.

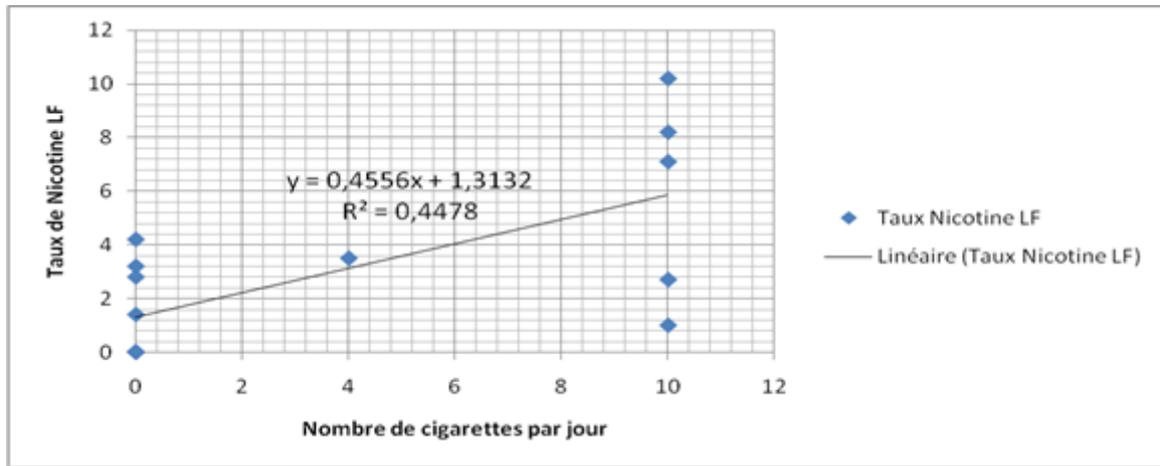
Considérant les demi-vies de la nicotine et de la cotinine, respectivement de 2 et 20 heures, et le fait que les patientes soient normalement indemnes de cigarette fumée au moment de leur ponction (12 heures de délai de sevrage tabagique demandé par les anesthésistes afin de permettre la réalisation de l’anesthésie générale pratiquée pour le geste de ponction ovocytaire inhérent à la technique de fécondation in vitro), nous pouvions nous attendre à ce que les taux de nicotine dans les liquides folliculaires des patientes fumeuses soient négatifs. Ces taux sont apparus positifs pour toutes les patientes sauf pour la patiente F01 qui présentait un taux de nicotine au seuil de détection.

Dans ce cadre, il est plus compréhensible que les taux de cotinine dans les liquides folliculaires soient statistiquement plus corrélés au nombre de cigarettes fumées par jour par les patientes que les taux de nicotine dans les liquides folliculaires.

Tableau 7 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et exposition tabagique des patientes

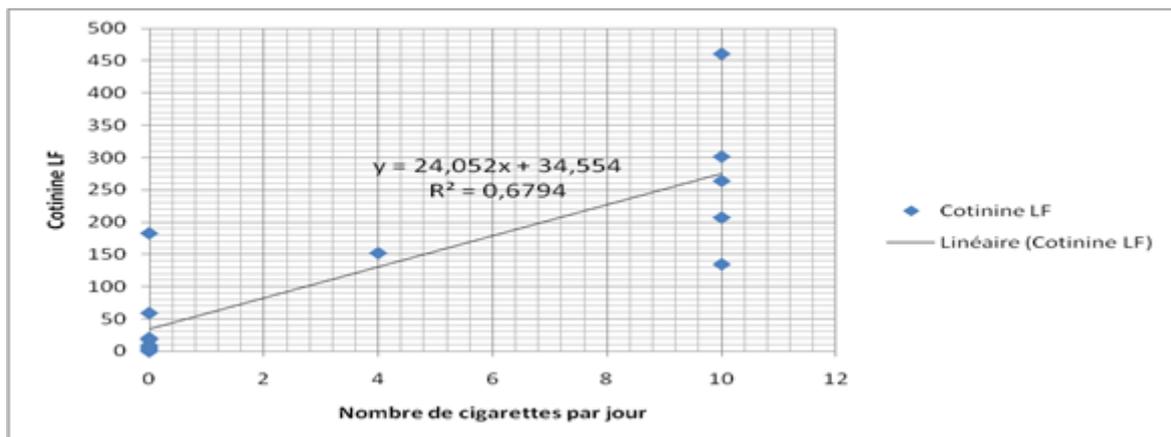
	Nombre de cigarettes /jour	Taux Nicotine LF (ng/ml)	Taux de Cotinine LF (ng/ml)
NF 01	0	3,2	59
NF 02	0	2,8	17,7
NF 03	0	1,4	182,6
NF 04	0	0	9,2
NF 05	0	4,2	20,2
NF06	0	0	0
NF08	0	0	3,4
NF09	0	0	6,2
NF10	0	0	0
F 01	10	1	134,6
F 02	10	7,1	460,4
F03	10	2,7	263,7
F04	4	3,5	151,9
F05	10	10,2	301,3
F06	10	8,2	206,9

Figure 6 : Régression linéaire entre les taux de nicotine dans les liquides folliculaires et l'exposition tabagique des patientes



Coefficient de corrélation (r_2) = 0.4478, $p=0,0063679$ (<0.01)

Figure 7 : Régression linéaire entre les taux de cotinine dans les liquides folliculaires et l'exposition tabagique des patientes



Coefficient de corrélation (r_2) = 0.6794, $p=0,0001573$ ($p<0.01$)

Synthèse

- Il existe une corrélation significative des taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires au tabagisme des patientes,
- C'est le taux de cotinine dans les liquides folliculaires qui est le plus corrélé au nombre de cigarettes fumées par jour par les patientes,
- La présence de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires pose la question d'un éventuel tabagisme passif

C. Corrélation des taux de nicotine et de cotinine dans les LF aux dosages de CO dans l'air expiré des patientes

Les taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires en fonction des dosages de CO dans l'air expiré des patientes sont présentés dans le tableau 8 (*Tableau 8 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et dosages de CO dans l'air expiré*).

Il a été retrouvé un dosage de CO positif chez 5 des 6 patientes fumeuses. Toutes les patientes non fumeuses avaient un dosage de CO négatif.

L'étude de régression linéaire retrouve un lien significatif (respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.01$) entre le dosage du taux de nicotine (Figure 8) et de cotinine (Figure 9) dans les liquides folliculaires et le dosage de CO dans l'air expiré des patientes.

Nous pouvons remarquer que si cette corrélation est statistiquement positive pour ces deux marqueurs, la corrélation du taux de cotinine dans les liquides folliculaires et du nombre de cigarettes fumées par la femme a une force statistique plus importante.

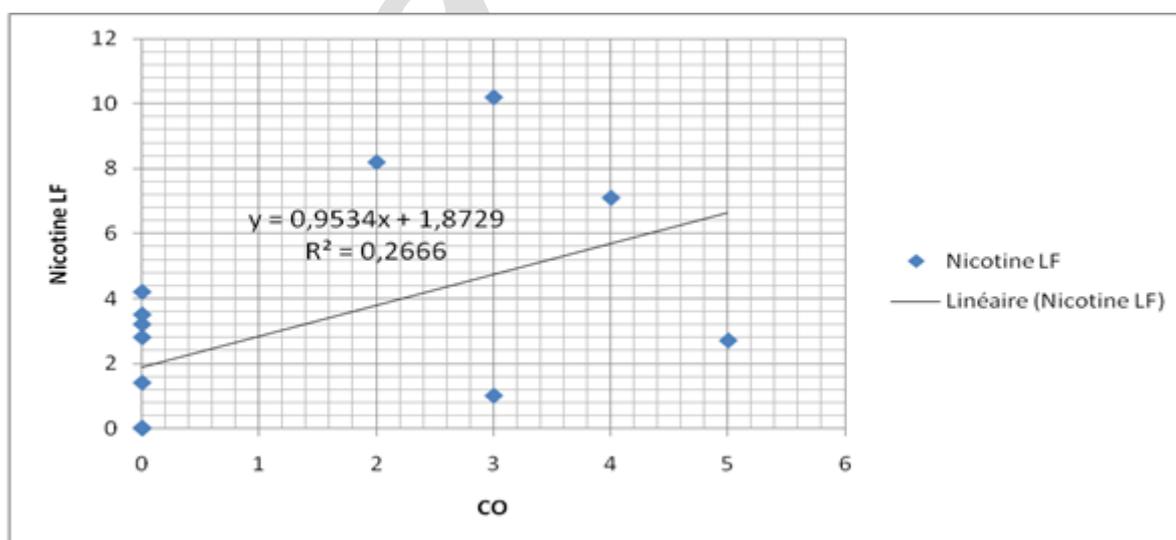
Toutes les patientes non fumeuses présentaient un dosage de CO dans l'air expiré négatif. Toutes les patientes fumeuses présentaient un dosage de CO dans l'air expiré positif sauf une, F04, fumeuse de 4 cigarettes/jour. Nous pouvons remarquer qu'il s'agit de la patiente fumeuse qui fume le moins de cigarettes /jour, toutes les autres patientes fumeuses fumant 10 cigarettes/jour. Chez cette patiente, les dosages de nicotine et de cotinine sont tout de même positifs (respectivement de 3.5 et 151.9 ng/ml).

L'élimination du CO dans l'air expiré est normalement de 2 à 5h. Prenant en considération ce paramètre et le fait que nos patientes devaient respecter un délai de 12 heures entre la dernière cigarette fumée et la ponction des ovocytes, nous pouvions nous attendre à ce que les dosages de CO dans l'air expiré de toutes nos patientes soient négatifs. Or les taux de CO étaient positifs chez 5 de nos patientes fumeuses, nous laissant nous interroger sur le respect de ce délai. Remarquons que pour toutes il était inférieur à 7 ppm, limite définissant un tabagisme faible à modéré.

Tableau 8 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et dosages de CO dans l'air expiré des patientes

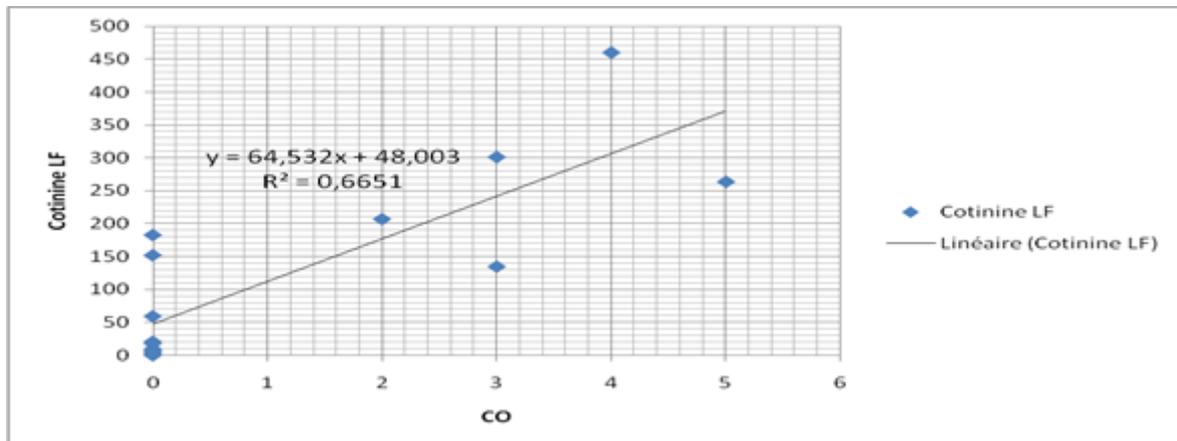
	Taux de CO air expiré (ppm)	Taux de Nicotine LF (ng/ml)	Taux de Cotinine LF (ng/ml)
NF 01	0	3,2	59
NF 02	0	2,8	17,7
NF 03	0	1,4	182,6
NF 04	0	0	9,2
NF 05	0	4,2	20,2
NF06	0	0	0
NF08	0	0	3,4
NF09	0	0	6,2
NF10	0	0	0
F 01	3	1	134,6
F 02	4	7,1	460,4
F03	5	2,7	263,7
F04	0	3,5	151,9
F05	3	10,2	301,3
F06	2	8,2	206,9

Figure 8 : Régression linéaire entre les taux de nicotine dans les liquides folliculaires et les dosages de CO dans l'air expiré des patientes



Coefficient de corrélation (r_2) = 0.2666, $p = 0,04876603$ ($p < 0.05$).

Figure 9 : Régression linéaire entre les taux de cotinine dans les liquides folliculaires et les dosages de CO dans l'air expiré des patientes



Coefficient de corrélation (r_2) = 0.6651, $p = 0,00021073$ ($p < 0.01$)

Synthèse

- Il existe une corrélation significative des taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires aux dosages de CO dans l'air expiré des patientes,
- C'est le taux de cotinine dans les liquides folliculaires qui est le plus corrélé aux dosages de CO dans l'air expiré des patientes,
- Le dosage de CO dans l'air expiré ne permet pas de dépister un éventuel tabagisme passif chez les patientes

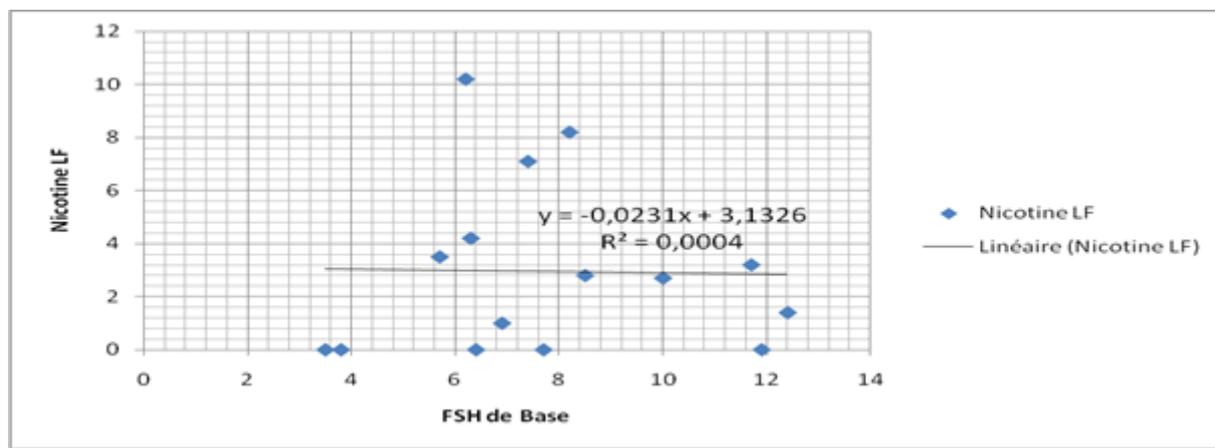
D. Corrélation des taux de nicotine et de cotinine dans les LF à la fonction ovarienne des patientes

Les valeurs de FSH des patientes au 2^{ème} ou au 3^{ème} jour du cycle en fonction des taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires sont présentées dans le tableau 9. L'étude de régression linéaire ne retrouve pas de lien significatif entre les taux de FSH et les dosages de nicotine (Figure 10) et de cotinine (Figure 11) dans les liquides folliculaires.

Tableau 9 : Taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et valeurs de FSH des patientes

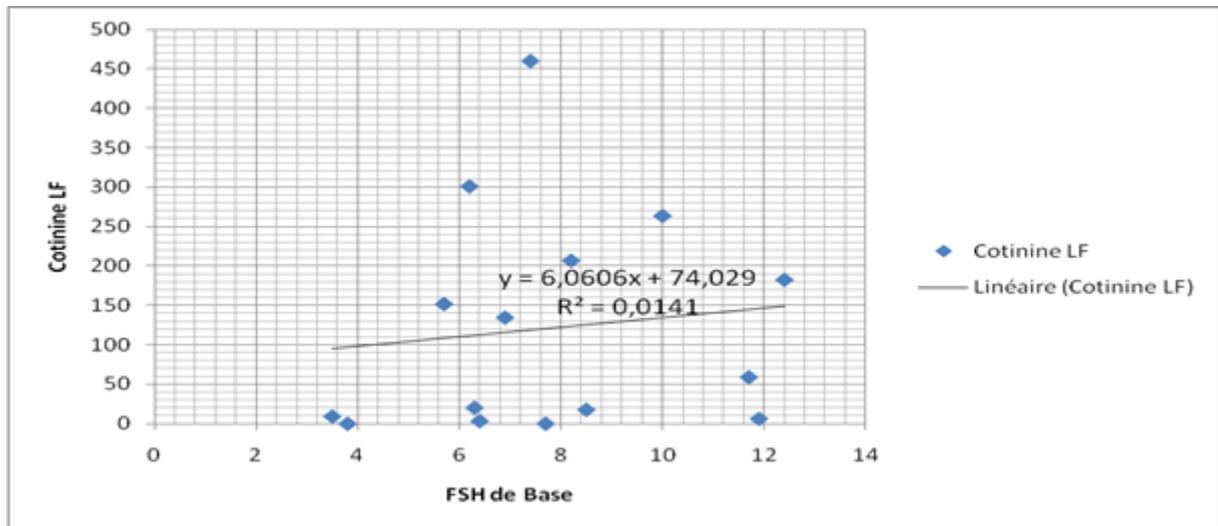
	FSH de Base (UI/L)	Taux de Nicotine LF (ng/ml)	Taux Cotinine LF (ng/ml)
NF 01	11,7	3,2	59
NF 02	8,5	2,8	17,7
NF 03	12,4	1,4	182,6
NF 04	3,5	0	9,2
NF 05	6,3	4,2	20,2
NF06	7,7	0	0
NF08	6,4	0	3,4
NF09	11,9	0	6,2
NF10	3,8	0	0
F 01	6,9	1	134,6
F 02	7,4	7,1	460,4
F03	10	2,7	263,7
F04	5,7	3,5	151,9
F05	6,2	10,2	301,3
F06	8,2	8,2	206,9

Figure 10 : Régression linéaire entre les taux de nicotine dans les liquides folliculaires et les valeurs de FSH des patientes



Coefficient de corrélation (r_2) = 0.0004, $p = 0,94533647$ (NS)

Figure 11 : Régression linéaire entre les taux de cotinine dans les liquides folliculaires et les valeurs de FSH des patientes



Coefficient de corrélation (r_2) = 0.0141, $p = 0,67311984$ (NS)

Synthèse

Il n'a pas été retrouvé de corrélation significative entre les taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et les taux de FSH de base des patientes

E. Corrélation des taux de nicotine et de cotinine dans les LF aux paramètres de l'AMP

Les résultats obtenus au cours de l'AMP en fonction des taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires sont présentés dans le tableau 10. L'étude de régression linéaire ne retrouve pas de lien significatif entre les paramètres de l'AMP et les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires.

Synthèse

Il n'a pas été retrouvé de corrélation significative entre les taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et les différents paramètres de l'AMP étudiés

Tableau 10 : Etude de la corrélation des taux de nicotine dans les liquides folliculaires aux paramètres de l'AMP

	Nicotine LF	Cotinine LF	Nbre unités FSH	Durée Stim	Taux E2 (pg/ml)	Endomètre (mm)	Nbre total Ovocytes	Nbre Ovocytes microinject	Ovocytes vus à 2 PN	Nbre total Emb à J2	Emb Type A	Nbre Emb Transf	Nbre Emb Cong	Gross.
NF 01	3,2	59	4050	9	2465	14	18	6	5	5	0	2	0	0
NF 02	2,8	17,7	3000	10	1574	11	13	9	5	6	2	2	0	0
NF 03	1,4	182,6	4500	15	3039	7	11	8	5	5	0	2	0	0
NF 04	0	9,2	1600	11	3963	12	21	14	5	5	1	2	2	0
NF 05	4,2	20,2	4200	12	2568	12	15	6	4	4	0	3	0	0
NF06	0	0	1950	13	1697	9	11	8	4	4	3	2	2	1
NF08	0	3,4	2000	10	3084	11,2	10	5	4	4	4	2	1	0
NF09	0	6,2	4200	14	1703	13	9	6	5	16	4	2	0	0
NF10	0	0	900	9	2134	10	12	5	4	4	1	2	0	0
F 01	1	134,6	1800	8	2031	8,5	9	7	4	3	0	0	0	0
F 02	7,1	460,4	1650	11	2172	11	9	5	3	3	2	2	0	1
F03	2,7	263,7	3900	12	2612	12	21	14	9	9	2	2	0	0
F04	3,5	151,9	1012,5	9	2100	11	13	3	3	3	2	1	0	1
F05	10,2	301,3	1500	10	2888	11	11	8	3	3	0	2	0	0
F06	8,2	206,9	4500	10	2805	8	6	6	4	3	1	2	0	0
r =		-	0,08	0,21	0,1	0,04	0,24	0,16	0,31	0,36	0,38	0,16	0,45	0,09
R2 =		-	0,01	0,04	0,01	0	0,06	0,03	0,1	0,13	0,15	0,02	0,2	0,01
p =		-	0,79	0,45	0,73	0,89	0,38	0,57	0,26	0,18	0,16	0,57	0,1	0,74

6. Présentation de la méthodologie établie dans le cadre du PHRC
« TABAFERTIMASC »

Ce PHRC, intitulé « TABAFERTIMASC » pour impact du TABAgisme sur la FERTilité MASculine a été enregistré sous la référence PHRC IR09, ID RCB : 2011-A00634-37.

Promoteur : CHU Amiens

Financement : Région Picardie

Responsable : Dr Aviva Devaux

Investigateurs : Dr R.Cabry, Dr E.Lourdel, Pr P.Merviel

A. Type d'étude mise en place

Le PHRC mis en place est une étude comparative, descriptive, monocentrique dont les inclusions se sont déroulées de manière prospective entre le 1^{er} janvier 2013 et le 31 octobre 2017 au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie du CHU d'Amiens. Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe PERITOX, PERInatalité et risques TOXiques (unité INERIS EA 4285-UMI 01) de l'Université Jules Verne d'Amiens, le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU d'Amiens et le service de Pharmacologie du CHU d'Amiens. Ce PHRC a obtenu l'approbation du Comité de Protection des Personnes (CPP) du CHU d'Amiens en juillet 2012.

B. Définition des objectifs

L'objectif principal du PHRC est d'évaluer l'impact du tabagisme sur la fertilité des couples, en comparant l'exposition aux PE de couples infertiles pris en charge au sein de notre centre d'AMP à celle de couples fertiles ayant conçu spontanément et dont la femme a accouché dans le service de Gynécologie-Obstétrique du même CHU.

Les objectifs secondaires du PHRC sont d'évaluer la corrélation des paramètres du spermogramme et du spermocytogramme, de la fragmentation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) spermatique et l'index de dénaturation des spermatozoïdes au statut tabagique des patients.

Dans le cadre de ce PHRC, nous avons développé plusieurs thématiques de recherche ancillaires dont les résultats seront ici présentés :

- Evaluation de l'exposition professionnelle et domestique aux pesticides sur la fertilité des couples par comparaison de l'exposition de couples fertiles et infertiles,
- Etude de l'impact du tabagisme sur les paramètres d'AMP de couples infertiles,
- Evaluation de la corrélation des dosages de nicotine (principal composé additif de la fumée de cigarette) et de cotinine (principal métabolite de la nicotine) dans les liquides folliculaires au statut tabagique des patientes,
- Evaluation de la corrélation des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires aux paramètres des tentatives d'AMP.

C. Définition des critères d'inclusion et d'exclusion

Afin de répondre à l'objectif principal précédemment cité, le protocole de recherche prévoyait la mise en place de deux groupes de patients : un groupe de patients dît « Infertiles» (Groupe IF) et un groupe de témoins dît « Fertiles » (Groupe F).

- Les couples inclus dans le groupe « Infertiles » étaient recrutés au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie du CHU d'Amiens, service dans lequel ils consultaient pour une infertilité primaire ou secondaire.
- Les couples inclus dans le groupe « Fertiles » étaient recrutés dans le secteur des suites de couches non pathologiques du service de Gynécologie-Obstétrique du CHU d'Amiens, service dans lequel les femmes venaient d'accoucher.
- Les couples inclus dans les deux groupes devaient maîtriser la langue française et être affiliés au régime de la Sécurité Sociale.

▪ **Définition des critères d'inclusion et d'exclusion des patients du groupe « Infertiles »**

Les **critères d'inclusion** retenus pour les couples du groupe « Infertiles » étaient les suivants :

- Femme âgée de 18 à 35 ans
L'âge maximum de 35 ans chez la femme a été retenu afin de limiter l'impact possible de celui-ci sur le développement ovocytaire et embryonnaire, en particulier en cas d'éventuelle Insuffisance Ovarienne Prématurationnée (IOP),
- Homme âgé de 18 à 45 ans
L'âge maximum de 45 ans chez l'homme a été retenu afin de limiter l'impact potentiel de celui-ci sur le développement embryonnaire,
- Prise en charge au cours d'une première ou deuxième tentative de FIV +/- ICSI

Les **critères d'exclusion** suivants ont été définis pour les couples du groupe « Infertiles » :

- Couples bénéficiant d'un don d'ovocytes ou d'un accueil d'embryons
- Couples pris en charge dans le cadre du circuit du risque viral : Couples porteurs d'une infection HIV, hépatite B ou hépatite C

▪ **Définition des critères d'inclusion et d'exclusion des patients du groupe « Fertiles »**

Les **critères d'inclusion** retenus pour les couples du groupe « Fertiles » étaient les suivants :

- Femme âgée de 18 à 35 ans
Ces limites d'âge ont été ainsi fixées pour permettre comparabilité des deux groupes
- Homme âgé de 18 à 45 ans
Ces limites d'âge ont également été ainsi fixées pour permettre comparabilité des deux groupes
- Grossesse donnant lieu à l'accouchement ayant été obtenue spontanément en moins d'un an
- Première ou deuxième grossesse

Il n'a pas été retenu de **critères d'exclusion** spécifique pour ce groupe.

D. Information des couples et recueil des consentements

L'information donnée aux couples était réalisée de manière standardisée par une technicienne de recherche clinique. Les fiches d'informations dédiées aux couples sont présentées respectivement en annexes 2 (*Annexe 2 : Fiche d'information dédiée aux couples du groupe « Infertiles »*) et 3 (*Annexe 3 : Fiche d'information dédiée aux couples du groupe « Fertiles »*).

Les couples acceptant de participer à cette étude recevaient et signaient, en présence d'un médecin de l'équipe, un consentement éclairé en fonction de leurs groupes, consentements présentés respectivement en annexes 4 (*Annexe 4 : Consentement éclairé couples du groupe « Infertiles »*) et 5 (*Annexe 5 : Consentement éclairé couples du groupe « Fertiles »*). Ces consentements autorisaient l'analyse anonymisée des données d'un questionnaire d'exposition toxique ainsi que la réalisation des prélèvements suivants :

- Chez les femmes du groupe de patients « Infertiles » : Sang, urines, cheveux et liquides folliculaires
- Chez les hommes du groupe patients « Infertiles » : Sang, urines, cheveux et liquides spermatiques
- Chez les femmes du groupe témoins « Fertiles » : Sang, urines et cheveux
- Chez les hommes du groupe témoins « Fertiles » : Sang, urines et cheveux

La réalisation d'un recueil spermatique était également proposée aux hommes du groupe fertile.

E. Questionnaire d'exposition toxique

Les couples ayant donné leur accord pour participer à cette étude ont complété un questionnaire détaillé d'exposition toxiques, selon leur sexe (homme ou femme) et leur groupe (fertile ou infertile). Au total, quatre questionnaires ont donc été rédigés : Questionnaire dédié aux femmes du groupe « Infertiles », aux hommes du groupe « Infertiles », aux femmes du groupe « Fertiles ») et aux hommes du groupe « Fertiles ». A titre d'exemple, le questionnaire dédié aux femmes du groupe « Fertiles » est présenté en annexe 6 (*Annexe 6 : Questionnaire d'exposition toxique dédié aux femmes du groupe « Fertiles »*). Ces questionnaires étaient complétés en présence d'une technicienne de recherche clinique qui réalisait également le recueil des données ainsi que l'anonymisation des questionnaires.

F. Dosages de CO (monoxyde de carbone) dans l'air expiré

Le CO (monoxyde de carbone) représente 2 à 5% des fumées de combustion expiré. Il est responsable de phénomènes d'hypoxie lors du tabagisme. Il est connu pour passer la barrière placentaire à l'origine d'une hypoxie chronique chez les foetus. L'impact chez les nouveaux nés de prématurité, de risque de mort subite et de troubles respiratoires est connu. L'évaluation du tabagisme ne peut se contenter des résultats d'enquête sur la consommation de tabac déclarée. L'utilisation d'un CO testeur dans l'air expiré par les couples suivis permet d'évaluer plus précisément cette consommation. Chaque membre du couple a donc été invité à réaliser un dosage de CO dans l'air expiré grâce à un CO Tester, et ce, quelque soit son statut tabagique des patientes (fumeur ou non fumeur). Les résultats sont exprimés en ppm (particules par minute). La valeur du CO recueillie était reportée à la fin du questionnaire d'exposition toxique avant d'être également anonymisée. La photographie suivante représente le CO Tester utilisé dans notre étude (CO tester de marque *COBABY*®).

La mesure du CO a été validée comme mesure indirecte de consommation de cigarettes, et elle est couramment pratiquée dans des programmes de sevrage tabagique. Cette mesure permet également d'évaluer l'exposition à un éventuel tabagisme passif. Le délai d'élimination du CO est normalement de 4 à 5 heures après la dernière cigarette. Certaines zones urbaines peuvent avoir un niveau environnemental de CO élevé, ce qui peut être à l'origine d'une augmentation du CO expiré de quelques ppm au-delà des valeurs normalement présentes dans le souffle. Dans ce cas, il est possible que le dosage de CO soit positif chez une personne non fumeuse et non exposée au tabagisme passif.

Figure 1 : Photographie du CO tester

utilisé dans notre étude

(Source photographie personnelle)



Tableau 11 : Tableau d'interprétation des valeurs de CO dans l'air expiré

(Source : manuel d'utilisation COBABY®)

CO (ppm)	Consommation de cigarette	Indicateur
0-6 ppm	Tabagisme nul ou faible	Vert
7-10 ppm	Tabagisme modéré	Jaune
11-20 ppm	Tabagisme important	Rouge
>20 ppm	Empoisonnement	Flash rouge

G. Protocoles de stimulation ovariennes chez les patientes du groupe infertile

Les patientes ont bénéficié d'un des trois protocoles de stimulation ovarienne en place dans le service :

- Le protocole agoniste long classique :

Administration de 0,1mg/jour de triptoréline, DECAPEPTYL (IPSEN PHARMA, Paris, France) à partir du 20^{ème} jour du cycle et de hMG ou de FSH après contrôle de désensibilisation ovarienne et jusqu'au déclenchement de l'ovulation,

- Le protocole adapté aux faibles réponses ovariennes :

Prise pendant 21 jours d'une pilule contraceptive orale de type VARNOLINE, éthinyloestradiol 0,030 mg/désogestrel 0,150 mg (SCHERING-PLOUGH, Levallois-Perret, France) à partir du premier jour du cycle précédent la stimulation. A l'arrêt de la pilule, administration de 0,025mg/jour de triptoréline, DECAPEPTYL (IPSEN PHARMA, Paris, France) et de hMG ou de FSH jusqu'au déclenchement de l'ovulation,

- Le protocole avec antagonistes de la GnRH :

Administration à partir du deuxième jour des règles de hMG ou de FSH. Quand un follicule atteint 14 mm ou quand le taux d'oestradiol atteint 400 pg/ml, administration supplémentaire de 0,25 mg de cetrotexil, CETROTIDE (MERCK LIPHA SANTE, Lyon, France) jusqu'au déclenchement de l'ovulation.

Les doses d'hMG ou de FSH étaient déterminées en fonction de l'âge de la patiente, des résultats du bilan hormonal réalisé au deuxième ou troisième jour du cycle, du compte des follicules antraux réalisé au deuxième ou troisième jour du cycle et du déroulement des stimulations antérieures éventuelles. Le déclenchement de l'ovulation était réalisé par choriogonadotropine α (MERCK LIPHA SANTE, Lyon, France).

H. Recueil ovocytaire

Le recueil ovocytaire était pratiqué par ponction transvaginale 36 heures après le déclenchement. La ponction ovocytaire était réalisée au bloc opératoire, sous anesthésie générale, à l'aide d'une sonde échographique endo-vaginale à laquelle était associée une aiguille et des seringues afin de réaliser le prélèvement. Après recueil, les liquides folliculaires étaient placés dans une étuve à 37° afin de maintenir la température corporelle jusqu'à leur analyse au laboratoire.

I. Techniques de mise en fécondation et de culture embryonnaire

A l'arrivée au laboratoire, le tri ovocytaire a été effectué pour isoler les complexes cumulo-ovocytaires (CCO). Les liquides folliculaires, habituellement considérés comme déchets biologiques et jetés, étaient conservés en vue de leur préparation pour congélation (*cf 6.11 : Préparation des matrices biologiques en vue de la recherche de toxiques*).

Deux techniques de fécondation ont pu être proposées en fonction de l'indication de l'infertilité : la Fécondation In Vitro dite « classique » (FIV) ou la FIV avec injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Dans le cadre de certaines indications (échec d'IIU, Inséminations Intra-Utérines), la moitié de la cohorte était traitée en FIV classique, l'autre moitié en FIV avec ICSI. Les spermatozoïdes ont été obtenus par masturbation le jour de la ponction, une préparation par gradient bi-couche a été réalisée pour éliminer le liquide séminal et les débris cellulaires, sélectionner les spermatozoïdes et assurer leur capacitation.

Pour la FIV classique, 2 heures après leur recueil, les CCO ont été mis en contact avec les spermatozoïdes mobiles progressifs préparés dans un milieu de culture pour fécondation (ORIGIO Séquential Fert™, VITROLIFE G-IVFTM) et mis à l'étuve pour une culture trigaz à 37°C.

Pour l'ICSI, une étape supplémentaire préalable de décoronisation des CCO (séparation des cellules du cumulus ovocytaire des ovocytes) par hyaluronidase (enzyme spécifique) a été réalisée. Cette décoronisation a permis la sélection des ovocytes matures (ovocytes en métaphase 2), aptes à être micro-injectés. La micro-injection a ensuite été réalisée en microgouttes grâce à un microscope inversé. Les ovocytes injectés ont ensuite été replacés dans un milieu de culture pour fécondation (ORIGIO SAGE-1step™, VITROLIFE G-TLTM) et mis à l'étuve pour une culture trigaz à 37°C.

Figure 13 : Photo d'un complexe cumulo-ovocytaire après tri des ovocytes
(Source : Interne au laboratoire)

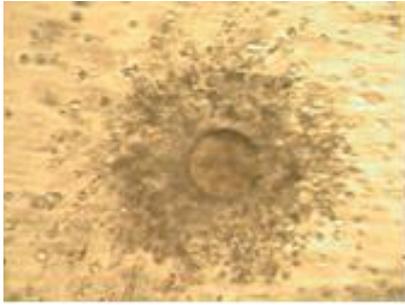


Figure 14 : Photo d'un ovocyte après décoronisation
(Source : Interne au laboratoire)



Les taux de fécondation ont été calculés 16 à 18h après l'insémination par l'observation au microscope des zygotes à 2 globules polaires (GP) et 2 pronucléi (PN). Ils ont été calculés selon le nombre le nombre de 2PN rapporté au nombre de CCO ponctionnés mis en fécondation pour les tentatives de FIV et, selon le nombre de 2PN obtenus à J1 rapportés au nombre d'ovocytes matures en métaphase 2 ponctionnés à J0 pour les tentatives d'ICSI.

La qualité embryonnaire a été analysée à J2 et J3 par l'évaluation de la cinétique de clivage embryonnaire et le taux de fragmentation embryonnaire selon le consensus d'Istanbul [137], dont les critères sont présentés en annexe 7 (*Annexe 7 : Cinétique de développement embryonnaire selon la classification d'Istanbul*). Dans cette classification, un embryon de bonne qualité correspond à un embryon de 4 blastomères avec un taux de fragmentation <30% à J2 ou à un embryon de 8 blastomères avec un taux de fragmentation <30% à J3.

Si une culture prolongée était décidée, les embryons étaient évalués au stade blastocyste (J5-J6) selon la classification de Gardner [138] prenant en compte l'expansion du blastocèle, le nombre de cellules de la masse cellulaire interne et la qualité du trophoctoderme, classification dont les critères sont présentés en annexe 8 (*Annexe 8 : Classification embryonnaire au stade blastocyste selon Gardner*). Le taux de blastulation a été calculé par le rapport du nombre de blastocystes obtenus dès le stade B1 sur le nombre total d'embryons poussés en culture prolongé.

J. Transfert embryonnaire et issue des tentatives

Le transfert intra-utérin des embryons n'était réalisé que si la qualité des embryons était jugée suffisante pour obtenir une grossesse. Le jour du transfert et le nombre d'embryon(s) transféré(s) (1 ou 2) étaient étudiés au cas par cas avec le couple. Le transfert était réalisé, après montage du (des) embryon(s) dans un cathéter de type ou, sous échoguidage. Les embryons surnuméraires de qualité suffisante ont été vitrifiés.

Un soutien de phase lutéale par progestérone micronisée par voie vaginale (200mg, 2 fois par jour) était systématiquement débuté dès le soir de la ponction ovocytaire et maintenu jusqu'à 8 Semaines d'Aménorrhées (SA) en cas de grossesse. Le test de grossesse était réalisé 15 jours après le transfert pour les embryons à J2 ou J3 et 12 jours après le transfert pour les embryons à J5 ou J6 par un dosage de β hCH plasmatique. En cas de positivité, un contrôle de la cinétique des β hCH était réalisé une semaine plus tard. La première échographie de grossesse était réalisée à 6 semaines d'aménorrhée.

Une grossesse biochimique était attestée par la présence de β hCH >100 UI aux prises de sang. Une grossesse clinique était confirmée par la présence d'un sac gestationnel avec activité cardiaque à l'échographie. Les taux d'implantation ont été calculés en fonction du nombre total d'embryons transférés par tentative rapporté au nombre de sacs gestationnels visualisés à l'échographie.

K. Préparation des matrices biologiques en vue de la recherche de toxiques

▪ Préparation des sangs

Les prélèvements sanguins étaient réalisés par une personne habilitée sur 2 tubes secs, non obligatoirement à jeun, pour chaque membre du couple ayant accepté de participer à l'étude (hommes et femmes du groupe « Fertiles » et du groupe « Infertiles »). Les tubes étaient centrifugés pendant 15 minutes à 4 000 tours / minute afin de récupérer les sérums qui étaient ensuite congelés à -20°C jusqu'à leur analyse.

- **Préparation des urines**

Les recueils d'urines étaient réalisés dans des tubes stériles d'ECBU (Etude Cyto-Bactériologique des Urines) qui étaient congelés sans préparation préalable à -20°C jusqu'à leur analyse.

- **Préparation des liquides folliculaires**

Les seringues contenant les liquides folliculaires et les cellules du cumulus ovocytaire ont été, une fois le tri ovocytaire réalisé, vidées dans des tubes de 15 ml (*Figure 15 : Photographie des tubes anonymisés avant centrifugation*).

Ces tubes ont été centrifugés à 2 000 RPM pendant 10 minutes afin de séparer les liquides folliculaires des éléments cellulaires (cellules de la granulosa et sang) (*Figure 16 : Photographie d'un tube après centrifugation*).

Après centrifugation, le surnageant a été placé dans des tubes anonymisés de 5 ml et congelé à -20°C pour conservation avant analyse finale (*Figure 17 : Photographie des tubes avant congélation*).

Figure 15 : Photo des tubes anonymisés avant centrifugation



Figure 16 : Photo d'un tube après centrifugation



Figure 17 : Photo des tubes avant congélation



L. Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires

Les dosages de nicotine et de cotinine ont été réalisés au sein du **service de Pharmacologie** du CHU d'Amiens. Après extraction des phases solides/liquides sur cartouche HLB (ASPEC), les liquides folliculaires ont été injectés puis analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Pour cette technique, 1 mL de milieu biologique est nécessaire aux dosages. Les limites de quantification étaient de 1 ng/ml pour la nicotine et de 2 ng/ml pour la cotinine. En cas de quantification <1ng/ml pour les dosages de nicotine et de 2ng/ml pour les dosages de cotinine, les dosages ont été considérés comme nuls dans l'analyse statistique. Nous spécifierons que les demi-vies de la nicotine et de la cotinine sont respectivement de 2 et 20 heures. La fiche technique de réalisation de ces dosages est présentée en annexe 9 (*Annexe 9 : Fiche technique de réalisation des dosages de nicotine et de cotinine*).

M. Détermination des taux de fragmentation de l'ADN et index de dénaturation spermatique

Chez l'homme, les examens de première intention dans le cadre de la réalisation d'un bilan d'infertilité sont le spermogramme et le spermocytogramme [139], techniques dont on connaît les limites car elles ne mettent pas toujours en évidence l'ensemble des anomalies spermatiques possibles [140]. La détermination des taux de fragmentation et index de dénaturation spermatiques (SDI) sont deux techniques d'études complémentaires des spermatozoïdes permettant d'établir le profil génétique et épigénétique des spermatozoïdes.

Tous les hommes du groupe « Infertiles » ont bénéficié d'un **spermogramme** et d'un **spermocytogramme**, examens réalisés selon les protocoles du service dans le cadre du bilan d'infertilité. La réalisation des deux techniques (détermination des taux fragmentation et des index de dénaturation spermatiques) nécessite la sélection, après recueil spermatique, des spermatozoïdes par la réalisation d'un **Test de Migration Survie (TMS)**.

La détermination du taux de fragmentation spermatique est une technique permettant d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes qui présentent des cassures simples des doubles brins de leur ADN. Est considéré comme anormal un taux de fragmentation strictement supérieur à 30% [141]. Cette détermination a été réalisée selon la technique TUNEL selon le protocole présenté en annexe 10 (*Annexe 10 : Technique de fragmentation de l'ADN spermatique*).

L'indice de dénaturation de l'ADN spermatique s'intéresse au niveau de maturation des spermatozoïdes. Lors de la spermiogenèse, les spermatozoïdes doivent subir une compaction (condensation) de leur chromatine pour être protégés au cours de leur transit dans les voies génitales masculines. Cette compaction de la chromatine permet également aux spermatozoïdes de mieux résister au stress oxydant, et en particulier aux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), produits naturels du métabolisme cellulaire. Un taux de chromatine décondensée supérieur à 30% est considéré comme anormal [141, 142], et comme discriminant entre hommes fertiles et les infertiles [143]. Cette détermination a été réalisée selon la technique utilisant le bleu d'aniline, selon le protocole présenté en annexe 11 (Annexe 11 : Technique de détermination de l'indice de dénaturation de l'ADN spermatique).

N. Méthodologie statistique

L'analyse statistique a été menée par des tests de χ^2 pour comparer les variables qualitatives et un test exact de Fischer lorsque les effectifs étaient réduits. Nous avons eu recours au test t de Student pour les variables quantitatives.

La valeur du p était fixée à 0.05 en analyse univariée avec odds ratio et un intervalle de confiance à 95%. Lorsque la significativité était atteinte en analyse univariée, l'analyse statistique était refaite en analyse multivariée, ce qui permettait de s'affranchir de l'influence des autres variables.

7. **Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse du PHRC « Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles ».**

Article en cours de traduction pour soumission en anglais

Introduction – Objectifs

Les pesticides et le tabac sont deux PE particulièrement représentés dans notre région. L'objectif principal de notre étude était de comparer l'exposition de couples infertiles et de couples fertiles à ces deux perturbateurs endocriniens.

Matériel et Méthode

Nous avons mené une étude comparative unicentrique prospective entre le 1^{er} janvier 2013 et le 31 octobre 2017. Le groupe de patients « Infertiles » était issu de couples pris en charge au centre d'AMP du CHU d'Amiens pour une 1^{ère} ou 2^{ème} tentative de FIV-ICSI. Le groupe de patients « Fertiles » était constitué à partir de couples oncus spontanément dont la femme avait accouché dans le même centre. L'analyse portait sur un questionnaire individuel d'exposition toxique et s'intéressait aux habitudes de vie notamment au tabagisme et à l'exposition domestique et professionnelle aux produits phytosanitaires.

Résultats

Nous avons pu réaliser l'exploitation des questionnaires de 81 couples du groupe de patients « Infertiles » et de 70 questionnaires du groupe de patients « Fertiles », soit un total de 302 questionnaires : 151 femmes et 151 hommes. Nous avons retrouvé une différence significative entre le tabagisme actuel des femmes avec 35.8% des femmes infertiles contre 17.1% des femmes fertiles qui étaient fumeuses ($p = 0.01$). Cette différence existait également entre le tabagisme passif des femmes et des hommes infertiles et fertiles, et ce, pour les différents stades de la vie.

Aucune différence d'exposition professionnelle aux pesticides n'a été retrouvée. Concernant l'exposition domestique, il est apparu que davantage de couples infertiles vivaient à proximité directe d'un champ de maïs (39.5% contre 24.3% des couples fertiles, $p = 0.02$).

Conclusion

Notre étude montre que le tabagisme actuel, une histoire de tabagisme passif, et le fait de vivre à proximité d'un champ de maïs sont des facteurs de risques d'infertilité.

Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse du PHRC « *Impact du tabagisme et de l'exposition aux pesticides sur la fertilité : Etude comparative de couples fertiles et infertiles* »,

Article en cours de traduction pour soumission en anglais

Dans le cadre du PHRC « TabacFertiMasc », nous avons réalisé les inclusions de 90 couples dans le groupe de patients dits « Infertiles » (Groupe IF) et 73 couples dans le groupe de patients dits « Fertiles » (Groupe F), soit un total de 163 couples entre le 1^{er} janvier 2013 et le 31 octobre 2017. Nous avons pu réaliser l'exploitation des questionnaires de 81 couples du groupe de patients « Infertiles » et de 70 questionnaires du groupe de patients « Fertiles », soit un total de 302 questionnaires : 151 femmes et 151 hommes.

A. Analyse de la population et étude de la comparabilité des groupes

Les caractéristiques générales des deux populations concernant en particulier l'âge, l'IMC, le niveau d'étude et la catégorie socio-professionnelle sont présentées dans le tableau 12 (*Tableau 12 : Caractéristiques générales des 2 groupes de patients fertiles et infertiles*).

L'âge moyen des couples, tous sexes confondus était de 31.1 ans dans le groupe des patients « Infertiles » et de 29.2 ans dans le groupe des témoins « Fertiles » (différence non significative, $p = 5.5$, IC 95% [0.9998 ; 2.8537]). Cependant, on retrouvait une différence significative entre les moyennes d'âge dans les sous-groupes de femmes et d'hommes en analyse univariée puis en analyse multivariée. En effet, les femmes « Infertiles » étaient plus âgées que les femmes « Fertiles » avec en moyenne 30.0 ans contre 27.7 ans ($p = 0.001$, OR à 1.22 [1.1 ; 1.37]) en analyse multivariée. Pour les hommes, le constat était le même avec une moyenne d'âge des hommes infertiles de 32.3 ans pour 30.7 ans chez les fertiles ($p = 0.004$, OR à 1.13 [1.04 ; 1.24]) en analyse multivariée.

L'indice de masse corporelle (IMC) moyen était de 24.7 kg/m² chez les infertiles et de 25.2kg/m² chez les fertiles, sans différence significative ($p = 0.35$, IC 95% [-0.5375 ; 1.501]). En analyse de sous-groupes, les femmes fertiles avaient un IMC à 25.4 et les infertiles à 23.9, différence également non significative ($p = 0.07$, IC à 95% [-0.13 ; 3.1406]). Les IMC des hommes fertiles et infertiles étaient également comparables.

Nous avons pu retrouver davantage d'**antécédents d'infertilité familiale** chez les femmes du groupe infertile. Cette différence était statistiquement significative en analyse univariée ($p = 0.02$) mais également en analyse multivariée ($p = 0.02$, OR à 13[1.5 ; 117.6]).

La majorité des participants à l'étude avait suivi un enseignement supérieur. La répartition des différentes catégories de **niveaux d'études** étaient comparables au sein des deux groupes d'étude. Pour la **catégorie socio-professionnelle**, notre population était majoritairement représentée par des employés, et ce, de manière comparable dans les deux groupes. Cependant il y avait plus de cadres dans la population fertile avec 27.1% contre 16.0% chez les infertiles (p à 0.03). Cette différence était surtout présente dans le sous-groupe des hommes (40,0% contre 18,0% avec un p = 0.009). Par ailleurs, il a été observé un nombre supérieur d'artisans et d'ouvriers (27,2 % contre 4,3%, p = 0.0001) parmi les hommes infertiles comparativement aux hommes fertiles.

Au total, concernant l'analyse des populations et la comparabilité des groupes,

nous pouvons retenir les éléments suivants :

- *Les femmes et les hommes du groupe des patients « Infertiles » étaient plus âgés que ceux du groupe des témoins « Fertiles »,*
- *Les femmes du groupe des patients « Infertiles » avaient plus souvent un antécédent d'infertilité familial que les femmes du groupe des témoins « Fertiles »*
- *Parmi les hommes du groupe des patients « Infertiles », il y avait davantage d'ouvriers et d'artisans et moins de cadres que chez les hommes du groupe des témoins « Fertiles »*

Tableau 12 : Analyse de la population et comparabilité des groupes

		Femmes n (%)		Hommes n (%)		P Femmes	P Hommes
		Infertile (n=81)	Fertile (n=70)	Infertile (n=81)	Fertile (n=70)		
Age (années)		30.0	27.7	32.3	30.7	0.0003	0.024
IMC (kg/m²)		23.9	25.4	25.4	24.9	0.07	0.39
Infertilité familiale		12	6	2	2	0.02	0.24
Niveau d'étude	Enseignement sup	47 (58)	49 (70)	43 (53.1)	29(41.4)	0.18	0.21
	Lycée	25 (30.9)	16(22.9)	33 (40.7)	35 (50)	0.36	0.33
	Collège	6 (7.4)	3 (4.3)	5 (6.2)	5 (7.1)	0.51	1
	Primaire	0	1 (1.4)	0	0	-	-
	Jamais scolarisé	0	1 (1.4)	0	1 (1.4)	-	-
Catégorie socio-professionnelle :	Cadres	11 (13.6)	16(22.9)	15 (18.5)	28(40.0)	0.20	0.009
	Employés	52 (64.2)	41(56.8)	25 (30.9)	13(18.6)	0.59	0.12
	Ouvriers/artisans	9 (11.1)	4 (5.7)	22(27.2)	3 (4.3)	0.26	0.0001
	Sans emploi	7 (8.6)	5 (7.1)	3 (3.7)	1 (1.4)	0.77	0.62

B. Exposition de la population étudiée au tabagisme

L'ensemble des résultats concernant l'exposition tabagique entre le groupe des patients « Infertiles » et le groupe des témoins « Fertiles » est présenté dans le tableau 13 (*Tableau 13 : Exposition de la population étudiée au tabagisme*). Il n'a pas été observé de différence entre les groupes fertiles et infertiles que ce soit entre les femmes ou les hommes en ce qui concernait l'**antécédent de tabagisme**. Nous pouvons retenir que 60% des femmes et 67% des hommes ayant participé à l'étude (Groupe de patients « Infertiles » et groupe de témoins « Fertiles ») avait déjà été fumeurs au cours de sa vie, sans différence significative de l'antécédant de tabagisme par rapport à la fertilité.

En revanche, quand on se limitait à l'analyse des **fumeurs ou fumeuses actuel(le)s**, on retrouvait une différence significative entre les femmes. Il y avait davantage de femmes infertiles qui fumaient (35.8%) par rapport aux femmes fertiles (17.1%), et ce de manière significative ($p = 0.01$, OR à 2.7 [1.25-5.82]) en analyse univariée. La différence existait toujours en analyse multivariée avec un p à 0.003, OR à 12.4 [3.2-48]. Aucune différence n'était mise en évidence entre les hommes fertiles et infertiles avec respectivement 40 % et 45.7 % de fumeurs actuels (p à 0.6).

Parmi les non-fumeurs actuels avec antécédent de tabagisme, si on s'intéressait au **délai depuis l'arrêt du tabac**, on s'apercevait que la population infertile avait stoppé sa consommation tabagique plus récemment que la population fertile même si ce résultat n'atteignait pas la significativité : 1.6 ans pour les femmes non fertiles contre 2.3 ans pour les femmes fertiles ($p = 0.16$, IC 95% [-0.3031 ; 1.8266]) et 1.8 ans pour les hommes infertiles contre 2.6 ans pour les hommes fertiles ($p = 0.3$, IC 95% à [-0.7921 ; 2.5202]).

Nous avons interrogé notre population de fumeurs sur le **nombre de cigarettes fumées par jour**. La moyenne du nombre de cigarettes fumées entre les femmes fertiles et infertiles était respectivement de 5.8 et de 2.4 cigarettes par jour avec une différence significative mise en évidence ($p = 0.002$, OR 0.91 [0.86 ; 0.97]) en analyse univariée. L'analyse multivariée retrouve cette différence ($p = 0.0009$, OR à 0.82 [0.72 ; 0.92]). Cette différence n'était pas retrouvée entre les hommes fertiles et infertiles qui fumaient respectivement 6.6 et 5.1 cigarettes par jour (p à 0.23, IC 95 % [-0.911 ; 3.8278]).

Nous nous sommes également intéressés au **nombre total d'années de tabagisme**, sans mettre en évidence de différence entre les hommes et les femmes des deux groupes concernant ce critère.

Lorsqu'on regarde la moyenne de **CO expiré** en particules par minutes (ppm), le taux de monoxyde de carbone expiré est plus faible chez les femmes et les hommes du groupe infertile mais de manière non significative.

Nous nous sommes également intéressés au **tabagisme passif à différentes périodes de la vie** des personnes interrogées. A toutes les périodes de la vie, la population du groupe infertile a été plus exposée au tabagisme passif que la population fertile, et ce de manière significative. Ceci est d'autant plus vrai dans l'enfance où 30.9 % des femmes infertiles ont été exposées contre seulement 10% des femmes fertiles (p à 0.003). Même constat pour les hommes avec un pourcentage observé de 38.3% contre 12.9% dans les populations infertiles et fertiles respectivement (p à 0.009). A l'adolescence et pendant la vie adulte, des différences significatives sont également retrouvées dans tous les sous-groupes avec une prévalence plus élevée de tabagisme passif dans le groupe des infertiles.

Au total, les facteurs de risque d'infertilité liés à l'exposition au tabagisme de la population étudiée étaient :

- Un tabagisme actuel féminin
- Un nombre de cigarettes fumées plus important chez les femmes du groupe « Infertiles » en comparaison aux femmes du groupe de témoins « Fertiles »
- Un tabagisme passif dans l'enfance et l'adolescence
- Un tabagisme passif à l'âge adulte

Tableau 13 : Exposition de la population étudiée au tabagisme

Exposition au tabac	Femmes		Hommes		p		
	Infertiles	Fertiles	Infertiles	Fertiles	Femmes	Hommes	
Antécédent de Tabagisme	48 (59.3)	43 (61.4)	54 (66.7)	48 (68.6)	0.79	0.80	
Tabagisme actuel	29 (35.8)	12 (17.1)	37 (45.7)	28 (40.0)	0.01 OR 2.7 [1.25;5.82]	0.60	
Nombre d'années de tabagisme	4.0	4.8	5.8	5.2	0.40	0.64	
Nombre de cigarettes par jour	2.4	5.8	5.1	6.6	0.002 OR 0.91 [0.86 ;0.97]	0.22	
CO expiré en ppm	0.4	0.6	1.8	2.9	0.57	0.19	
Délai depuis l'arrêt du tabac	1.6	2.3	1.8	2.6	0.3	0.3	
Tabagisme passif :	Enfance	25 (30.9)	7 (10)	31 (38.3)	9 (12.9)	0.003	0.0008
	Adolescence	26 (32.1)	10 (14.3)	30 (37.0)	11 (15.7)	0.02	0.006
	Age adulte	27 (33.3)	8 (11.4)	31 (38.3)	13 (18.6)	0.003	0.03

C. Facteurs d'exposition toxique professionnelle de la population étudiée

Aucune différence d'exposition professionnelle aux pesticides n'a été mise en évidence dans notre groupe d'étude que ce soit en termes de **métiers à risque d'exposition** ou d'**usages de pesticides sur le lieu de travail**. Devant les faibles effectifs observés dans nos sous-catégories de type d'exposition professionnelle aux pesticides, nous avons décidé de regrouper ces facteurs afin d'augmenter la puissance statistique de l'analyse. En dépit de ces regroupements, il n'a pas été mis en évidence de différence entre l'exposition des groupes fertile et infertile dans notre étude. L'ensemble des résultats sont présentés dans le tableau 14 (*Tableau 14 : Exposition toxique professionnelle de la population étudiée*).

Parmi les hommes, on observait une tendance avec davantage d'agriculteurs (12.3 % contre 5.7 %) et de métiers à risque de contact professionnel avec les pesticides tels que le maraîchage, la vente de fruits et légumes, le travail en jardinerie ou l'horticulture (16.0% contre 1.0%), mais ces résultats n'étaient pas statistiquement significatifs. En ce qui concerne l'usage déclaré de pesticides dans un cadre professionnel, les pourcentages entre les hommes fertiles et infertiles étaient sensiblement égaux à 17.1 et 17.3% respectivement. Chez les femmes, on retrouvait un usage déclaré de pesticides dans un cadre professionnel supérieur chez les fertiles par rapport au infertiles avec 14.3 et 8.6% mais cela n'était pas significatif.

Nous avons également voulu comparer l'**usage de matériels de protection** dans le cadre de l'utilisation de produits phytosanitaires. Il n'y avait pas non plus de différence d'usages de combinaisons, de gants ou de masques entre les deux groupes fertiles et infertiles.

Enfin, concernant plus généralement les risques professionnels, nous avons interrogé notre population sur ses **horaires de nuit** et sur son éventuelle **exposition à la chaleur**. Il y avait plus d'hommes infertiles exposés à la chaleur sur leur lieu de travail mais cela n'était pas significatif (9.9% contre 2.9%, p à 0.11). Concernant les horaires de nuit, ceux-ci ne semblaient également pas être associés à l'infertilité, que ce soit chez les hommes ou les femmes.

Au total, en ce qui concerne l'exposition professionnelle aux pesticides de la population étudiée, nous n'avons pas identifié de différence entre les sous-populations de femmes et d'hommes infertiles et fertiles.

Tableau 14 : Exposition toxique professionnelle de la population étudiée

		Femmes n (%)		Hommes n (%)		p	
Exposition professionnelle		Infertiles n = 81	Fertiles n = 70	Infertiles n = 81	Fertiles n = 70	Femmes	Hommes
Facteurs d'exposition professionnelle		8(9.9)	11(15.7)	19(23.5)	14(20.0)	0.40	0.75
Métier à risque d'exposition aux PPS		1(1.2)	2(2.9)	13(16.0)	7(1.0)	0.60	0.39
Agriculture		1 (1.2)	2(2.9)	10(12.3)	4 (5.7)	0.60	0.26
Usage de P.phyosanitaires		7 (8.6)	10(14.3)	14(17.3)	12(17.1)	0.40	1
Protection		6 (7.4)	6 (8.6)	19(23.5)	11(15.7)	1	0.32
Gants		5 (6.2)	3 (4.3)	9 (11.1)	6 (8.6)	-	-
Combinaison		0	1 (1.4)	5 (6.2)	1 (1.4)	-	-
Masque		1 (1.2)	2 (2.9)	5 (6.2)	4 (5.7)	-	-
Exposition à la chaleur		3 (3.7)	0	8 (9.9)	2 (2.9)	0.25	0.11
Horaires :	Uniquement de jour	70 (90.9)	53 (84.1)	66 (82.5)	47 (69.1)	0.34	0.09
	Jour / nuit	7 (8.6)	10(14.3)	14(17.3)	21(30.0)	0.4	0.1

D. Facteurs d'exposition toxique domestique de la population étudiée

Dans notre questionnaire, nous avons cherché à quantifier le taux d'exposition aux **pesticides** domestiques éventuels. Pour cette évaluation, nous avons également dû regrouper des facteurs de risque à cause d'effectifs relativement faibles. Ainsi nous avons additionné les facteurs d'exposition tels que « pratique régulière du jardinage », « le fait d'avoir jardiné avant l'âge de 15 ans » et « l'usage domestique déclaré de produits phytosanitaires ». Nous obtenions pour résultats de zéro à trois facteurs d'exposition présents et avons comparé chaque sous-catégorie au fait de n'avoir aucun facteur d'exposition.

Le nombre de facteurs d'exposition des hommes et des femmes infertiles aux pesticides domestiques éventuels était identique à celui des hommes et des femmes fertiles. La plupart des sujets de l'étude avait un seul facteur d'exposition, et ce, de manière similaire dans les sous-groupes fertile et infertile. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau 15 (*Tableau 15 : Exposition toxique domestique de la population étudiée*).

L'un de nos facteurs d'analyse était la pratique du jardinage pour son usage potentiel de pesticides tels que les herbicides ou les insecticides. Sur le plan individuel, le groupe des femmes infertiles jardinait davantage avec 37% des femmes qui pratiquaient cette activité contre seulement 30% des femmes fertiles. Cette différence n'était pas significative ($p=0.46$).

Chez les hommes, ce sont respectivement 38.3% et 37.1% chez les infertiles et les fertiles qui pratiquent le jardinage (p à 1). Nous avons voulu regarder si le fait d'avoir pratiqué cette activité avant l'âge de 15 ans, âge correspondant à la période de maturation pubertaire, pouvait avoir une incidence. La pratique précoce du jardinage n'était pas significativement différente entre les hommes et les femmes infertiles et fertiles avec des pourcentages de 14.8 contre 21.4 chez les hommes (p 0.42), et 17.3 contre 14.3% chez les femmes (p : 0.75, tableau X).

Le **lieu d'habitation** pouvant constituer un facteur d'exposition aux pesticides, nous nous sommes interrogés sur l'impact de celui-ci à différentes étapes de la vie sur la fertilité. Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les hommes et les femmes des groupes fertiles et infertiles sur le critère de l'habitat dans l'enfance, dans l'adolescence ou à l'âge adulte pour les couples concernés. La tendance observée était que les sujets du groupe infertile étaient plutôt ruraux dans l'enfance et l'adolescence avec par exemple 32.1% des femmes infertiles contre 25.7% des femmes fertiles habitant à la campagne dans l'enfance (p à 0.16). A l'âge adulte, c'est le même constat avec une population infertile qui était majoritairement rurale avec 55.6% contre 47.1% des couples fertiles, mais cela n'atteignait pas la significativité (p : 0.30, tableau X).

Tableau 15 : Exposition toxique domestique de la population étudiée

Exposition domestique		Femmes n (%)		Hommes n (%)		p	
		Infertile	Fertile	Infertile	Fertile	Femmes	Hommes
Facteurs toxiques domestiques	Aucun facteur	18 (22.2)	19 (27.1)	18 (22.2)	20 (28.6)	-	-
	Un facteur	34 (42)	34 (48.6)	35 (43.2)	27 (38.6)	0.29	0.55
	Deux facteurs	17 (21)	11 (15.7)	19 (23.5)	13 (18.5)	0.62	0.38
	Trois facteurs	12 (14.8)	6 (8.6)	9 (11.1)	10 (14.3)	0.29	0.57
Habitat Enfance	Ville	29 (35.8)	34 (48.6)	34 (42.0)	30 (43.5)	0.11	0.85
	Campagne	52 (32.1)	36 (25.7)	47 (29.0)	39 (27.9)	0.16	0.90
Habitat Adolescence	Ville	34 (21.0)	27 (16.7)	34 (24.3)	32 (21.4)	0.52	0.17
	Campagne	34 (21.0)	36 (22.9)	54 (33.3)	37 (26.4)	0.52	0.12
Habitat Adulte	Ville	36 (44.4)	37 (52.9)	36 (44.4)	37 (52.9)	0.30	0.30
	Campagne	30 (37.0)	21 (30)	31 (38.3)	26 (37.1)	0.46	1
Jardinage	Avant 15 ans	14 (17.3)	10 (14.3)	12 (14.8)	15 (21.4)	0.75	0.42

Nous avons également voulu voir si l'entourage direct de l'habitat pouvait interférer avec la fertilité. Le tableau 16 présente les résultats des facteurs d'exposition domestique liés au lieu de vie de la population étudiée (*Tableau 16 : Facteurs d'exposition domestique liés au lieu de vie de la population étudiée*).

Nous avons d'abord regardé si la **proximité de l'habitat avec des champs cultivés** était différente entre les sujets infertiles et fertiles. Aucune différence n'était retrouvée entre les groupes. Les couples infertiles avaient plus souvent un champ cultivé à proximité de leur habitat avec 72.8% des couples infertiles exposés contre 61.4% des couples fertiles mais sans significativité statistique ($p : 0.16$). Si on détaille les **types de cultures entourant l'habitat des couples**, on voit que les champs de blé, de maïs et de colza sont majoritairement représentés autour des maisons des couples infertiles avec des taux à 45.7, 39.5 et 9.9 % contre 34.3, 24.3 et 4.3% chez les couples fertiles. Seules les cultures de maïs étaient significativement plus fréquentes autour de l'habitat des couples infertiles ($p : 0.002$).

La **proximité d'un aéroport ou d'une autoroute** a été recherchée dans l'entourage de l'habitat de notre population. En effet, ces infrastructures sont le lieu d'usage de pesticides en abondance afin d'écartier la présence et la gêne liée à certains nuisibles. L'analyse montrait qu'il y avait plus fréquemment une autoroute ou un aéroport proche de l'habitat des couples infertiles par rapport aux couples fertiles avec 28.4 % contre 21.4 %. Cependant cette différence n'atteignait pas la significativité ($p : 0.43$, tableau 16). Cette différence n'était pas non plus retrouvée lors de l'analyse de la **proximité de l'habitat des couples avec une zone industrielle**.

Concernant le **type de logement**, 87.7% des couples infertiles et 78.6% des couples fertiles vivaient en maisons individuelles, 12.3% des couples infertiles et 21.4% des couples fertiles vivaient en appartements. Il n'y avait pas de différence significative sur ce critère ($p : 0.50$ et 0.30).

Nous nous sommes également intéressés au **mode de chauffage** des couples. Parmi les infertiles, 32.1% utilisaient le gaz, 45.7% utilisaient l'électricité et 17.3% utilisaient le fioul. Parmi les fertiles ces pourcentages étaient de 35.7%, 50% et 12.9%. Il n'était pas mis en évidence de différence entre les modes de chauffage des couples fertiles et infertiles.

Au total, concernant les facteurs d'exposition toxique domestique, nous n'avons pu identifier que la localisation du logement à proximité directe d'un champ de maïs comme facteur de risque d'infertilité.

Les autres sources d'exposition domestique aux pesticides n'ont pas montré de différence en termes de fertilité sur notre population.

Tableau 16 : Facteurs d'exposition domestique liés au lieu de vie de la population étudiée

Exposition domestique aux pesticides		Couples infertiles N = 81	Couples fertiles N = 70	p
Proximité du domicile (<1km)	Champs cultivés :	59 (72.8)	43 (61.4)	0.19
	Blé	37 (45.7)	24 (34.3)	0.06
	Mais	32 (39.5)	17(24.3)	0.002
	Colza	8 (9.9)	3 (4.3)	0.10
	P. de terre	7 (8.6)	12 (17.1)	0.19
	Autoroutes/aéroport	23 (28.4)	15 (21.4)	0.43
	Industries polluantes	17 (21.0)	15 (21.4)	1
Logement	Maison individuelle	71 (87.7)	55 (78.6)	0.50
	Appartement	10 (12.3)	15 (21.4)	0.30
Chauffage	Gaz	26 (32.1)	25 (35.7)	0.79
	Electricité	37 (45.7)	35 (50.0)	0.76
	Fioul	14 (17.3)	9 (12.9)	0.61

8. Présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse du PHRC

« Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de 90 patientes prises en charge en FIV +/-ICSI, impact du tabagisme sur la fertilité »,

Article en cours de rédaction

Nous avons décidé de mener l'analyse des résultats du PHRC en deux axes principaux :

Axe 1 : *Existe-t-il une corrélation entre les paramètres des tentatives d'AMP réalisées et le statut tabagique des couples ?*

Axe 2 : *Existe-t-il une corrélation entre les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et les paramètres des tentatives d'AMP réalisées ?*

Axe 1 : Existe-t-il une corrélation entre les paramètres des tentatives d'AMP réalisées et le statut tabagique des couples ?

Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une analyse progressive des résultats dont la démarche sera ici présentée, initialement en analyse univariée puis en analyse multivariée.

A. « Analyse 4 Groupes »

Dans un premier temps, nous avons décidé de mener une analyse statistique en considérant 4 groupes de patients en fonction de leur statut tabagique :

- ***G1 : Aucun des deux membres du couple n'est fumeur (n= 47 soit 52% des couples)***
- ***G2 : La femme est fumeuse, l'homme non (n= 7 soit 8% des couples)***
- ***G3 : L'homme est fumeur, la femme non (n= 16 soit 18% des couples)***
- ***G4 : Les deux membres du couple sont fumeurs (n= 20 soit 22% des couples)***

Cette première analyse statistique nous a permis d'objectiver que nos populations étaient comparables en termes d'âges, d'IMC, de durées et de types d'infertilité ainsi que d'indications de prise en charge. Il n'est également pas apparu de différence significative concernant le type d'ovulation entre les patientes des différents groupes, ni concernant les paramètres appréciant la réserve ovarienne (FSH à J2 ou J3 et taux d'AMH).

Il n'a également pas été observé de différence statistiquement significative concernant les paramètres spermatiques classiques (volume, numération, mobilité, formes typiques) ainsi que la fragmentation et l'index de dénaturation de l'ADN spermatique. Les tableaux 17 et 18 présentent respectivement les éléments de comparabilité des groupes chez la femme et chez l'homme.

Tableau 17 : Caractéristiques des femmes en fonction du statut tabagique des couples

		G1 <i>n = 47</i>	G2 <i>n = 7</i>	G3 <i>n = 16</i>	G4 <i>n = 20</i>	Total <i>n = 90</i>	p
Age Femme		30,3± 3,3	31,0± 3,6	31,0 ± 3,94	29,2± 3,3	30,2±3,5	0,384
IMC Femme		24,0± 4,6	21,0± 2,7	23,2 ± 5,5	23,5± 3,9	23,5±4,5	0,439
Durée d'infertilité (années)		3,9 ± 1,7	3,3 ± 2,9	3,5 ± 1,6	4,2 ± 2,1	3,8 ± 1,9	0,637
Type Infertilité Femme	Primaire	45	5	14	15	79	0,056
	Secondaire	2	2	2	5	11	
Type Infertilité Couple	Primaire	32	4	9	13	58	0,824
	Secondaire	15	3	7	7	32	
ATCD d'IAC	Non	27	7	10	14	58	0,160
	Oui	20	0	6	6	32	
Type Ovulation	Normale	30	7	8	11	56	0,413
	SOPK	11	0	6	6	23	
	IOP	6	0	2	3	11	
Endométriose	Non	39	5	11	17	72	0,540
	Oui	8	2	5	3	18	
Taux de FSH basal (UI/L)		6,6 ± 2,1	6,2 ± 2,9	6,7 ± 1,4	7,2 ± 4,1	36,7±2,7	0,784
Taux d'AMH (ng/mL)		5,7 ± 4,7	2,2 ± 0,6	7,5 ± 11,1	4,4 ± 2,7	5,5± 6,3	0,311

Nous retiendrons cependant l'élément suivant, qui, sans atteindre la significativité, nous est apparu comme une tendance dont nous avons ensuite voulu approfondir l'analyse : Un taux d'infertilité féminin de type secondaire à la limite de la significativité ($p = 0.056$), avec un taux plus important d'infertilité secondaire dans les deux groupes où la femme était fumeuse (29% dans G2 et 25% dans G4) comparativement aux groupes où la femme n'était pas fumeuse (4% dans G1 et 13% dans G3).

Tableau 18 : Caractéristiques des hommes en fonction du statut tabagique des couples

		G1 <i>n = 47</i>	G2 <i>n = 7</i>	G3 <i>n = 16</i>	G4 <i>n = 20</i>	Total <i>n = 90</i>	p
Age		32,4 ± 3,7	34,1 ± 4,1	33,8 ± 7,2	32,1 ± 5	32,7 ± 4,8	0,579
IMC		24,6 ± 3,6	23,9 ± 5	25,1 ± 4,4	25,4 ± 4,5	24,8 ± 4	0,805
Type Infertilité Homme	Primaire	45	7	16	19	87	0,780
	Secondaire	2	0	0	1	3	
Numération (millions/mL)		62,4 ± 57,3	71,3 ± 81,2	89,4 ± 113,4	81,6 ± 74,3	72,1 ± 75	0,587
Mobilité Total (%)		44,2 ± 15,6	40,3 ± 3,7	45,1 ± 18,4	44,8 ± 12,5	44,2 ± 14,8	0,904
Mobilité a + b (%)		36,7 ± 15,3	32 ± 6,2	38 ± 17,2	38,6 ± 12	37 ± 14,4	0,765
Formes typiques (%)		22,7 ± 18	29,4 ± 26,7	22,6 ± 24,1	22,2 ± 15,6	23 ± 19,2	0,844
SDI (%)		28,9 ± 17,4	26,3 ± 6,6	21,4 ± 17,2	28,9 ± 17,4	27,1 ± 16,5	0,744
Fragmentation (%)		20,7 ± 13,3	14,8 ± 14,6	23,1 ± 21,3	18,2 ± 13,2	20,1 ± 15	0,842

Il n'a pas été observé de différence significative des paramètres d'AMP ainsi que des issues de celles-ci entre nos différents groupes (tableau non présenté).

Confrontés au manque de puissance lié au faible effectif de nos groupes, nous avons décidé de mener deux autres analyses statistiques considérant le statut tabagique des femmes et des hommes, indépendamment de celui de leur conjoint(e).

Ces deux analyses complémentaires ont été intitulées :

*« Analyse 2 Groupes en fonction du statut tabagique de la femme » (présentée en B)
et « Analyse 2 Groupes en fonction du statut tabagique de l'homme » (présentée en C)
Le rapprochement des groupes a été possible car nos populations sont bien comparables
d'un groupe à l'autre.*

B. « Analyse 2 Groupes en fonction du statut tabagique des femmes »

Afin d'augmenter la puissance statistique de nos données, nous avons décidé de mener une seconde analyse statistique en considérant deux groupes de patients en fonction du statut tabagique des femmes, indépendamment du statut tabagique de leur conjoint :

- **G FNF : Femmes Non Fumeuses (63 soit 70% des couples)**
- **G FF : Femmes Fumeuses (27 soit 30% des couples)**

Nous nous sommes, tout particulièrement intéressés, dans cette seconde analyse, aux paramètres qui pouvaient avoir un lien avec le tabagisme féminin.

▪ **Etude de la comparabilité des groupes**

Le tableau 19 présente les caractéristiques des femmes en fonction de leur statut tabagique. Il est apparu des populations comparables en termes d'âges, d'IMC, de durées d'infertilité et d'indications de prise en charge. Il n'est également pas apparu de différence significative concernant le type d'ovulation entre les patientes des différents groupes, ni concernant les paramètres appréciant la réserve ovarienne (FSH à J2 ou J3 et taux d'AMH). Concernant le type d'infertilité qui avait retenu notre attention dans l'analyse initiale en 4 groupes, nous avons pu mettre en évidence un taux d'infertilité féminine de type secondaire significativement plus important chez les femmes fumeuses (6% chez les femmes non fumeuses vs 26% chez les femmes fumeuses, $p = 0.009$).

▪ **Caractéristiques des tentatives en fonction du statut tabagique des femmes**

Le tableau 20 présente les différents paramètres des tentatives en fonction du statut tabagique des femmes. Il n'est apparu aucun paramètre significativement différent entre nos deux groupes de femmes non fumeuses et fumeuses.

Nous retiendrons cependant les éléments suivants, qui, sans atteindre la significativité, nous sont apparus comme des tendances qui nous ont interrogées :

- Un taux moyen d'estradiol au déclenchement plus bas dans le groupe des femmes fumeuses comparativement à celui du groupe des femmes non fumeuses (1933 pg/mL vs 2269 pg/mL, $p = 0.101$)
- Une quantité de FSH par ovocyte ponctionné plus élevée dans le groupe des femmes fumeuses comparativement à celle du groupe des femmes non fumeuses (362 vs 250, $p = 0.15$)
- Un pourcentage d'ovocytes utilisables en ICSI plus élevé dans le groupe des femmes non fumeuses comparativement à celui des femmes fumeuses (74.01% vs 63.1%, $p = 0.08$)
- Un pourcentage d'embryons de type A plus élevé dans le groupe des femmes fumeuses comparativement à celui des femmes non fumeuses (31.5 vs 21.9, $p = 0.165$)
- Avec cependant un pourcentage plus faible d'association de transfert frais et de congélation dans le groupe de femmes fumeuses comparativement à celui des femmes non fumeuses (18.5% vs 38.1%, $p = 0.069$).

▪ **Issues des tentatives en fonction du statut tabagique des femmes**

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative concernant les issues d'AMP en fonction du statut tabagique des femmes, qu'il s'agisse des taux de grossesses après transfert frais, après transfert d'embryons congelés ou des taux de grossesses cumulés (tableau non présenté).

Tableau 19 : Caractéristiques des femmes en fonction de leur statut tabagique

		<i>Femmes non Fumeuses</i> <i>n =63</i>	<i>Femmes Fumeuses</i> <i>n =27</i>	<i>Total</i> <i>n =90</i>	<i>p</i>
Age Femme		30,4 ± 3,5	29,6 ± 3,4	30,2 ± 3,5	0,308
IMC Femme		23,8 ± 4,8	22,9 ± 3,8	23,5 ± 4,5	0,384
Durée d'infertilité (années)		3,8 ± 1,7	3,9 ± 2,3	3,8 ± 1,9	0,791
Type Infertilité Femme	Primaire	59	20	79	0,009
	Secondaire	4	7	11	
Type Infertilité Couple	Primaire	41	17	58	0,848
	Secondaire	22	10	32	
ATCD d'IAC	Non	37	21	58	0,084
	Oui	26	6	32	
Type Ovulation	Normale	38	18	56	0,848
	SOPK	17	6	23	
	IOP	8	3	11	
Endométriose	Non	50	22	72	0,818
	Oui	13	5	18	
Taux de FSH basal (UI/L)		6,6 ± 2	7 ± 3,8	6,7 ± 2,7	0,574
Taux d'AMH (ng/mL)		6,3 ± 7,4	3,8 ± 2,6	5,5 ± 6,3	0,131

Tableau 20 : Caractéristiques des tentatives en fonction du statut tabagique des femmes

		<i>Femmes non Fumeuses n =63</i>	<i>Femmes Fumeuses n =27</i>	<i>Total n =90</i>	<i>p</i>
Rang de ponction		1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,908
Nombre d'unités de FSH		2074 ± 1157	2307 ± 1099	2144 ± 1139	0,377
Durée de Stimulation (jours)		11,7 ± 2,2	12,2 ± 1,6	11,8 ± 2	0,285
Taux moyen d'oestradiol au déclenchement (pg/ml)		2269 ± 945	1933 ± 706	2168 ± 889	0,101
Endomètre (mm)		10,9 ± 2,3	10,9 ± 2,4	10,9 ± 2,3	0,976
Technique	FIV	16	11	27	0,067
	ICSI	33	15	48	
	MI FIV MI ICSI	14	1	15	
Nombre Total ovocytes		12,4 ± 5,9	11,9 ± 5,8	12,3 ± 5,8	0,710
Nombre Ovocytes utilisés		10,3 ± 5,4	9,4 ± 4,8	10 ± 5,2	0,457
% Ovocytes utilisables en ICSI		74 ± 19,5	63,1 ± 21,3	70,5 ± 20,5	0,080
Quantité de FSH par ovocyte ponctionné		240 ± 261	362 ± 537	276 ± 367	0,150
Quantité de FSH par ovocyte utilisé		346 ± 331	364 ± 438	352 ± 368	0,847
Taux de fécondation (%)		63,5 ± 23,9	68 ± 25,1	64,8 ± 24,2	0,425
Nombre embryons obtenus		6,3 ± 4	5,4 ± 3,6	6 ± 3,8	0,315
Nombre embryons de type A		1,2 ± 1,3	1,6 ± 2	1,3 ± 1,6	0,253
% Embryons de type A		21,9 ± 26,2	31,6 ± 35	24,7 ± 29,2	0,165
Transfert	Non	19	9	28	0,766
	Oui	44	18	62	
Nombre Embryons transférés		1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,4	0,290
Freeze all	Non	55	23	78	0,787
	Oui	8	4	12	
Transfère frais + Congélation	Non	39	22	61	0,069
	Oui	24	5	29	
Nombre Embryons congelés		3,3 ± 1,9	4,8 ± 3,8	3,6 ± 2,4	0,114
Nombre Embryons utilisables		2,9 ± 2,2	2,7 ± 2,9	2,9 ± 2,4	0,681
Nombre de TEC réalisés		1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1

C. « Analyse 2 Groupes en fonction du statut tabagique des hommes »

Afin d'augmenter la puissance statistique de nos données, nous avons décidé de mener une troisième analyse statistique en considérant deux groupes de patients en fonction du statut tabagique des hommes, indépendamment du statut tabagique de leur conjointe :

- **G HNF : Hommes Non Fumeurs (54 soit 60% des couples)**
- **G HF : Hommes Fumeurs (36 soit 40% des couples)**

Nous nous sommes, tout particulièrement intéressés, dans cette troisième analyse, aux paramètres qui pouvaient avoir un lien avec le tabagisme masculin.

▪ Etude de la comparabilité des groupes

Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les critères d'âges, d'IMC, de types et de durées d'infertilité ainsi que d'indications.

▪ Caractéristiques des paramètres spermatiques en fonction du statut tabagique des hommes

Ces résultats sont présentés dans le tableau 21 : Aucun critère n'est apparu significativement différent.

Tableau 21 : Caractéristiques des paramètres spermatiques en fonction du statut tabagique des hommes

	<i>Hommes non-fumeurs n =54</i>	<i>Hommes Fumeurs n =36</i>	<i>Total n =90</i>	<i>P</i>
Age	32,6 ± 3,7	32,9 ± 6,1	32,72 ± 4,8	0,823
IMC	24,5 ± 3,8	25,2 ± 4,4	24,8 ± 4	0,391
Durée Infertilité (années)	3,8 ± 1,9	3,9 ± 1,2	3,8 ± 1,9	0,946
Type Infertilité Homme	Primaire	52	87	0,811
	Secondaire	2	3	
Numération (millions/mL)	63,5 ± 60,1	85 ± 92,3	72,1 ± 75	0,184
Mobilité Total (%)	43,7 ± 14,7	44,9 ± 15,1	44,2 ± 14,8	0,696
Mobilité a+b (%)	36,1 ± 14,5	38,3 ± 14,4	37 ± 14,4	0,480
Formes typiques (%)	23,5 ± 19,2	22,4 ± 19,5	23 ± 19,2	0,778
SDI (%)	28,6 ± 16,2	25,4 ± 17,2	27,1 ± 16,5	0,557
Fragmentation (%)	19,8 ± 13,3	20,5 ± 17,1	20,1 ± 15	0,889

- **Caractéristiques des tentatives d'AMP en fonction du statut tabagique des hommes**

Il n'est apparu aucun paramètre significativement différent entre nos deux groupes d'hommes non fumeurs et fumeurs (tableau non présenté).

- **Issues des tentatives en fonction du statut tabagique des hommes**

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative concernant les issues d'AMP en fonction du statut tabagique des hommes, qu'il s'agisse des taux de grossesses après transfert frais, après transfert d'embryons congelés ou des taux de grossesses cumulés (tableau non présenté).

Nous avons enfin souhaité mener une quatrième analyse prenant en compte l'exposition d'au moins un des deux (ou des deux) membres du couple au tabagisme. Cette analyse a été intitulée « Analyse Exposés / Non exposés » et est présentée en D

D. « Analyse Exposés / Non exposés »

Nous nous sommes donc intéressés à la notion d'exposition d'au moins un des deux membres du couple (ou des deux) en comparaison au groupe de couples non fumeurs en réalisant une quatrième analyse.

- **G Non-Exposés : Couples non fumeurs (G1 = 47 soit 52% des couples)**
- **G Exposés : Femmes et/ou hommes fumeurs (G2 + G3 + G4 = 43 soit 48% des couples)**

- **Etude de la comparabilité des groupes**

Les tableaux 22 et 23 permettent d'apprécier respectivement les caractéristiques féminines, masculines en fonction de la notion d'exposition ou non.

Comme dans l'analyse en deux groupes en fonction du tabagisme féminin, seul le critère d'infertilité primaire est apparu significatif en fonction de la notion d'exposition ou non.

Tableau 22 : Caractéristiques féminines en fonction de la notion d'exposition ou non

		<i>Non Exposés</i> <i>n =47</i>	<i>Exposés</i> <i>n =43</i>	<i>Total</i> <i>n =90</i>	<i>p</i>
Age Femme		30,3 ± 3,3	30,1 ± 3,6	32,2 ± 3,5	0,875
IMC Femme		24 ± 4,6	23 ± 4,4	23,5 ± 4,6	0,301
Type Infertilité Femme	Primaire	45	34	79	0,016
	Secondaire	2	9	11	
Type Ovulation	Normale	30	26	56	0,886
	SOPK	11	12	23	
	IOP	6	5	11	
Trompes	Normales	33	25	58	0,232
	Altérées	14	18	32	
Endométriose	Non	39	33	72	0,460
	Oui	8	10	18	
Taux de FSH basal (UI/L)		6,6 ± 2,1	6,9 ± 3,1	6,7 ± 2,7	0,659
Taux d'AMH (ng/mL)		5,7 ± 4,7	5,3 ± 7,4	5,5 ± 6,3	0,784

Tableau 23 : Caractéristiques masculines en fonction de la notion d'exposition ou non

		<i>Non Exposés</i> <i>n =47</i>	<i>Exposés</i> <i>n =43</i>	<i>Total</i> <i>n =90</i>	<i>p</i>
Age Homme		32,4 ± 3,7	33,1 ± 5,8	32,7 ± 4,8	0,512
IMC Homme		24,6 ± 3,6	25 ± 4,4	24,8 ± 4	0,618
Type Infertilité Homme	Primaire	45	42	87	0,610
	Secondaire	2	1	3	
Numération (millions/mL)		62,4 ± 57,3	82,8 ± 89,8	72,1 ± 75	0,198
Mobilité totale (%)		44,2 ± 15,6	44,2 ± 14	44,2 ± 14,8	0,997
Mobilité a+b (%)		36,7 ± 15,3	37,3 ± 13,5	37 ± 14,4	0,856
Formes typiques (%)		22,7 ± 18	23,5 ± 20,6	23,1 ± 19,2	0,835
SDI (%)		29 ± 17,4	25,5 ± 16	27 ± 16,5	0,528
Fragmentation (%)		20,7 ± 13,3	19,6 ± 16,5	20,1 ± 14,9	0,838

▪ **Caractéristiques des tentatives en fonction de l'exposition tabagique ou non des couples**

Tableau 24 : *Caractéristiques des tentatives en fonction de l'exposition tabagique ou non des couples*

		<i>Non Exposés n =47</i>	<i>Exposés n =43</i>	<i>Total n =90</i>	<i>p</i>
Rang de ponction		1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,714
Nombre d'unités de FSH		2104 ± 1206	2187 ± 1073	2144 ± 1139	0,733
Durée de Stimulation (jours)		11,9 ± 2,2	11,8 ± 1,8	1,8 ± 2	0,932
Taux moyen d'oestradiol au déclenchement (pg/ml)		2224 ± 946	2108 ± 830	2168 ± 889	0,539
Endomètre (mm)		11,1 ± 2,3	10,6 ± 2,2	10,9 ± 2,3	0,229
Technique	FIV	10	17	27	0,028
	ICSI	25	23	48	
	Mi FIV - Mi ICSI	12	3	15	
Nombre total ovocytes		13 ± 6	11,5 ± 5,6	12,3 ± 5,8	0,235
Nombre d'ovocytes utilisés		10,7 ± 5,5	9,3 ± 4,8	10 ± 5,2	0,203
% Ovocytes utilisables en ICSI		74,6 ± 21	66,1 ± 19,5	70,5 ± 20,5	0,143
Quantité de FSH par ovocyte ponctionné		245 ± 291	310 ± 436	276 ± 367	0,410
Quantité de FSH par ovocyte utilisé		369 ± 369	337 ± 372	352 ± 368	0,710
Taux de fécondation (%)		64,7 ± 24,6	65 ± 24,1	64,8 ± 24,2	0,952
Nombre Embryons		6,67± 4	5,4 ± 3,5	6,1 ± 3,8	0,112
Nombre Embryons de type A		1,2 ± 1,4	1,4 ± 1,75	1,3 ± 1,6	0,682
% Embryons de type A		21,2 ± 25,5	28,6 ± 32,6	24,8 ± 29,2	0,244
Transfert	Non	17	11	28	0,196
	Oui	30	32	62	
Nombre d'Embryons transférés		1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,4	0,646
Freeze all	Non	39	39	78	0,282
	Oui	8	4	12	
Transfert frais + Congélation	Non	30	31	61	0,402
	Oui	17	12	29	
Nombre d'Embryons congelés		3,5 ± 1,9	3,9 ± 3,1	3,6 ± 2,4	0,620
Nombre d'Embryons utilisables		3 ± 2,3	2,7 ± 2,6	2,9 ± 2,4	0,592
Nombre de TEC réalisés		1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1

▪ **Caractéristiques des issues de tentatives en fonction de l'exposition tabagique ou non des couples**

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative concernant les issues d'AMP en fonction de la notion ou non d'exposition, qu'il s'agisse des taux de grossesses après transfert frais, après transfert d'embryons congelés ou des taux de grossesses cumulés (frais + congelés), les résultats sont présentés dans le tableau 25.

Tableau 25 : Caractéristiques des issues de tentatives en fonction de l'exposition tabagique ou non des couples

		<i>Non Exposés</i> <i>n =47</i>	<i>Exposés</i> <i>n =43</i>	<i>Total</i> <i>n =90</i>	<i>P</i>
Grossesse	Non	17	22	39	0,265
	Oui	15	11	26	
Type de grossesse	Biochimique	1	1	2	0,910
	FCS	2	2	4	
	Evolutive	12	8	20	
Caractéristique de la Grossesse	Unique	6	5	11	0,651
	Gémellaire	2	1	3	
	Triple	1	0	1	
Grossesse TEC	Non	5	4	9	0,667
	Oui	4	2	6	
Taux de grossesse cumulés	Non	29	31	60	0,296
	Oui	18	12	30	
Type de grossesse en TEC	Biochimique	0	0	0	0,221
	FCS	2	0	2	
	Evolutive	2	2	4	

Suite à la réalisation de ces analyses univariées, nous avons ensuite réalisé des analyses multivariées dont les résultats probants seront en suite présentés

E. « Analyse Multivariées »

Nous présenterons l'analyse multivariée réalisée sur le critère de la réalisation ou non d'une congélation au sein de notre population.

Tableau 26 : Analyse multivariée sur le critère de la réalisation ou non d'une congélation embryonnaire

	p	OR	IC pour OR 95%	
			Inférieur	Supérieur
Exposé tabac (ref =non)	0,049	0,116	0,013	0,993
Taux de nicotine liquide folliculaire	0,366	0,785	0,465	1,327
Age Femme	0,076	0,805	0,633	1,023
Type Infertilité Femme (ref = primaire)	0,769	0,683	0,053	8,770
Ovulation	0,210			
SOPK	0,366	2,338	0,370	14,762
IOP	0,145	0,059	0,001	2,668
Endometriose (ref =non)	0,340	3,372	0,277	41,018
Technique Utilisée	0,039			
ICSI	0,021	0,064	0,006	0,666
Mi FIV - mi ICSI	0,629	0,525	0,039	7,135
Type Stimulation (ref = agoniste)	0,415	2,771	0,238	32,205
Nombre Total d'Ovocytes	0,815	1,023	0,848	1,234
Taux Fécondation Globale	0,110	1,035	0,992	1,080
FSH par Ovocyte Ponctionné	0,231	0,995	0,986	1,004
Jour du transfert	0,515			
J2	0,999	95020358,900	0,000	.
J3	0,999	115176907,734	0,000	.
J5	0,999	19932105,988	0,000	.
Nombre Embryons Transfères	0,050	0,070	0,005	1,003

Cette analyse nous permet de retenir qu'en cas d'exposition d'un des deux membres du couple (ou des deux) au tabac, il y a significativement moins de réalisation de congélation embryonnaire. Notre analyse nous permet également de retenir que plus l'âge de la patiente est élevé, moins il y a de congélation embryonnaire.

L'association d'un tabagisme actif ou passif chez une patiente, et ce, d'autant plus qu'elle est âgée, est donc un facteur de non réalisation d'une congélation embryonnaire.

Axe 2 : Existe-t-il une corrélation entre les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et les paramètres des tentatives d'AMP réalisées ?

Dans un premier temps, nous avons étudié leur corrélation au statut tabagique des couples.

A. Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et statuts tabagiques des couples (Tableau 27)

	<i>Femmes non Fumeuses</i> (n = 63)	<i>Femmes Fumeuses</i> (n = 27)	<i>p</i>
Nicotine (ng/mL)	0,1494	5,1037	0,02
Cotinine (ng/mL)	11,4159	95,5363	0,01
	<i>Hommes non-fumeurs</i> (n = 54)	<i>Hommes Fumeurs</i> (n = 36)	
Nicotine (ng/mL)	0,9826	2,6153	0,288
Cotinine (ng/mL)	16,0481	67,5578	0,01

Il existe une bonne corrélation entre les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et le statut tabagique des patientes.

Comme nous l'avons déjà prouvé (Etude préalable de mise au point des dosages, Master 2), cette corrélation est plus importante pour la cotinine que pour la nicotine, dont on sait qu'elle a une demi-vie plus longue.

Le dosage de cotinine dans les liquides folliculaires apparait d'autre part comme un marqueur de l'exposition de la femme au tabagisme passif.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la corrélation entre ces dosages et :

- Les paramètres féminins
- Les paramètres des tentatives d'AMP
- Les issues des tentatives d'AMP

B. Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et paramètres féminins

Il a été observé un lien significatif entre la présence d'une endométriose et les dosages de nicotine dans les liquides folliculaires ($p = 0.05$), résultat présenté dans le tableau 28.

Tableau 28 : Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et caractéristiques féminines

		Dosage moyen de Nicotine LF (ng/mL)	p	Dosage moyen de Cotinine LF (ng/mL)	p
Type d'ovulation	Normale	1,40	0,149	32,79	0,557
	SOPK	0,41		34,82	
	IOP	5,38		60,12	
Trompe	Normale	0,56	0,054	29,11	0,211
	Altérée	3,57		50,30	
Endométriose	Non	0,58	0,05	33,08	0,380
	Oui	5,82		50,92	
Infertilité féminine	Primaire	1,66	0,917	31,46	0,078
	Secondaire	1,42		74,75	
ATCD IAC	Non	2,33	0,211	44,16	0,212
	Oui	0,37		23,04	

C. Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et paramètres des tentatives d'AMP

Là encore, il n'a pas été mis en évidence de lien significatif entre les paramètres des tentatives d'AMP et les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires (tableau non présenté).

D. Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et issues des grossesses

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative concernant les issues d'AMP et les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires (Tableau 29).

Tableau 29 : Dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et issues des grossesses

		Dosage moyen de nicotine LF (ng/mL)	p	Dosage moyen de cotinine LF (ng/mL)	p
Grossesse	Non	0,81	0,281	39,25	0,643
	Oui	0,40		30,28	
Type de grossesse	Biochimique	0,56	0,338	57	0,647
	FCS	1,05		54,25	
	Evolutive	0,25		22,81	
Caractéristique Grossesse	Unique	0,19	0,653	28,6	0,944
	Gémellaire	0,61		28	
	Triple	0		0	
Grossesse TEC	Non	0,12	0,108	12,66	0,125
	Oui	1,13		59,31	
Grossesse cumulée	Non	2,18	0,303	37,82	0,839
	Oui	0,53		34,30	

E. Tests de corrélation des différents paramètres des tentatives d'AMP en fonction des dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires

Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 30. Les critères suivants sont apparus comme statistiquement significatifs :

- Le taux d'estradiol au déclenchement (pg/mL) est inversement corrélé au dosage de nicotine (coefficient de corrélation à -0.219, $p = 0.038$)
- Le nombre d'ovocytes mis en fécondation en FIV est corrélé au dosage de nicotine (coefficient de corrélation à +0.413, $p = 0.047$) et de cotinine (coefficient de corrélation à + 0.389, $p = 0.013$)
- Les taux de fécondation en ICSI sont corrélés au dosage de nicotine (coefficient de corrélation à +0.291, $p = 0.047$)

Tableau 30 : Corrélation entre les différents paramètres des tentatives d'AMP et les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires (seuls les p significatifs ont été indiqués)

	Nicotine Liquides folliculaire (ng/mL)	Cotinine Liquides folliculaires (ng/mL)
Nb unité de FSH	0,041	0,114
Taux d'estradiol au déclenchement (pg/mL)	- 0,219 (p=0,038)	-0,128
Endomètre (mm)	0,046	0,072
Nombre d'ovocytes micro-injectés en ICSI	- 0,151	-0,134
Nombre d'ovocytes mis en fécondation en FIV	0,413 (p=0,008)	0,389 (p=0,013)
Nombre d'ovocytes utilisés	- 0,064	- 0,002
% ovo utilisables en ICSI	- 0,137	- 0,125
Nombre d'ovocytes 2PN	-0,031	-0,037
Taux de fécondation en ICSI	0,291 (p=0,047)	0,249 (p=0,092)
Taux de fécondation en FIV	0,043	- 0,025
Taux de fécondation global	0,176	0,074
Dose de FSH par ovocyte ponctionné	0,073	0,100
Dose de FSH par ovocyte utilisé	-0,045	-0,047
Nombre d'embryons à J2	-0,059	-0,111
% Embryons à J2 / Nombre d'ovocytes utilisables	-0,035	-0,085
% Embryons à J2 / Nombre d'ovocytes fécondés	-0,210 (p=0,074)	-0,181
% d'embryons de type A à J2	0,069	0,052
Nombre d'embryons transférés	- 0,001	-0,017
Nombre d'embryons congelés	-0,003	-0,035
Nombre d'embryons utilisables	-0,073	-0,095

9. Réalisation d'une plaquette d'informations à destination des couples en âge de procréer sur la thématique « Perturbateurs Endocriniens, Attention à ma fertilité »

Fort des résultats de nos études, nous avons souhaité réaliser une plaquette d'informations concernant l'impact des PE sur la fertilité à destination des couples en âge de procréer. Ce document a pour objectifs de prévenir les troubles de la fertilité des couples en âge de procréer et d'augmenter les chances de concevoir des couples suivis en Assistance Médicale à la Procréation. Il est présenté selon les axes suivants :

- *Qu'est ce qu'un Perturbateur Endocrinien ?*
- *Où peut-on trouver des Perturbateurs Endocriniens ?*
- *Quelles sont les gestes de prévention simples à adopter ?*
- *Quelles sont les périodes de la vie les plus à risque ?*
- *Y at-il des métiers à risque ?*

Où peut-on trouver des Perturbateurs Endocriniens ?

➤ Dans les cigarettes

Le tabac est en effet constitué de nombreuses substances dont certaines ont une activité avérée de perturbateur endocrinien

➤ Dans notre alimentation et dans l'eau que nous buvons

- Pesticides ingérés par les fruits et les légumes que nous mangeons
- Contenants alimentaires en plastique
- Boîtes de conserve
- Canettes en métal
- Bouteilles en plastique
- Ustensiles de cuisine en téflon (poêles...)
- Biberons en plastique chez les nouveau-nés

➤ Dans les produits cosmétiques que nous utilisons

- Shampoings, déodorants, maquillage
- Crèmes et crèmes solaires
- Solutions hydroalcooliques
- Vernis à ongles et dissolvants
- Teintures de cheveux

➤ Dans les produits ménagers utilisés pour le ménage

➤ A l'intérieur de notre maison

- Peintures, colles et revêtements de sols
- Jeux en plastiques pour les enfants



PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Attention à ma Fertilité !!



Qu'est-ce qu'un Perturbateur Endocrinien ?

C'est une substance capable d'interférer avec les différentes hormones ou les organes qui les produisent et donc de provoquer des pathologies.



Quels sont les gestes de prévention simples à adopter ?



- **Ne pas fumer**
Attention, le tabagisme passif peut aussi vous exposer à ces risques
- **Choisir une alimentation bio ou bien laver les fruits et légumes**
- **Boire de l'eau du robinet ou de bouteilles en verre plutôt qu'en plastique**
- **Ne pas faire réchauffer d'aliments au micro-onde dans des contenants en plastique, ni les recouvrir de film**
- **Eviter les boites de conserve et les canettes en métal**
- **Choisir des produits cosmétiques sans phtalates et sans parabènes**
- **Eviter de vous teindre les cheveux**
- **Utiliser des gants de protection pour faire le ménage**
- **Bien aérer les espaces intérieurs (maison-travail)**
- **Ne pas utiliser de parfums ou de désodorisants intérieurs**
- **Ne pas utiliser d'herbicides et d'insecticides dans le jardin**

Quelles sont les périodes de la vie les plus à risque ?

- Pendant la grossesse
- Au cours de l'allaitement
- Le nouveau-né et le jeune enfant
- L'adolescent au moment de sa puberté
- Les couples en âge de procréer

Y a-t-il des métiers à risque ?

- Agriculteurs, viticulteurs, jardiniers
- Professions médicales et paramédicales
- Agent d'entretien ou femme de ménage
- Hôtesse de caisse
- Coiffeur, coiffeuse ou esthéticienne
- Professions dans l'industrie chimique ou pharmaceutique



Si l'un de ces métiers est le vôtre, renseignez-vous auprès de votre médecin du travail sur les risques potentiels d'exposition et les moyens à mettre en œuvre pour les éviter.

10. Présentation de l'article intitulé « *Impact of prenatal and postnatal exposure to Chlorpyrifos (CPF) on the Wistar rat's offspring* ».

Article en cours de relecture pour soumission en anglais

Impact of prenatal and postnatal exposure to Chlorpyrifos (CPF) on the Wistar rat's offspring

Cabry-Goubet R^{1,2}, Scheffler F^{1,2}, Darwiche W², Gay-Queheillard J², Delanaud S², Cauet H.², Bach V.², Benkhalifa M.^{1,2}, Copin H.¹, Devaux A.^{1,2},

¹Medecine and Biology of reproduction Cytogenetic CECOS Picardie University Hospital Amiens, France

² PeriTox Perinatalité & Toxic risks, UMR-I01 INERIS, Amiens, France

Introduction

Organophosphate insecticides represent a major class of agricultural chemicals that are used in different fields of crops: wheat, corn, vegetables, fruits. The impact of pesticides is a challenge for our Health. It is important to evaluate the impact of pesticides on human health because exposure to these compounds has been linked to harmful effects in many research studies. This exposure may be particularly harmful during the early stages of development (e.g. the prenatal period). Worldwide, one million tons are now dispersed each year. FRANCE is the top user in Europe and the third in the world, nearly 70000 tons (2009) with 90% for agriculture. PICARDIE a northern region in France use 5,500 tons/year.

Chlorpyrifos (CPF: O,O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate) is one of the most widely used organophosphorus insecticides. It induces an overstimulation of neuronal leading to neurotoxicity and death of the insect. Their presence in the food chain and / or the contamination of our natural environment is the bio-accumulation. Thus, we are exposed on a daily basis. It is not only detected in food and in drinking water (Bolleshgiagric food chem 1999, Testal handbook Elsevier 2010) but also in several body fluid such as maternal milk (Mattssontoxicolsoci 2000) umbilical-cord serum (BarrNew Jersey sci total environ 2010). This suggest that chlorpyrifos can cross the placental barrier (eskenasi environ health perspect 1999; 107 (sup3) and can be detected in meconium (Haraux Karen Chardon).

Chronic exposure and low level of pesticides can induce blood disorders, brain and nerve damage, and cancer (Gold et al 2001 Handbook of pesticides p799-844) modification of ileal muscle strips (Darwiche et al NeurogastroMotil 2017) a decrease of follicle stimulating hormone in albinos rats through the increase of lipid peroxidation (madhavi et kumar 2010 int j pharm sci res 86—92).

A decreasing of body weight, appetite, milk production and trouble of cycle have been describe to be associated with low dose exposure to pesticides in human and farm animals (Tiemann 2008). Moreover, some pesticides seems more toxic to females than to males in certain species (Mancini et al 2005). CPF seems cause some developmental defects when exposed orally in rats (Adigun 2010; Shalaby 2013).

The aim of this study is the evaluation of chlorpyrifos exposure (organophosphate pesticide) and impact on rats Wistar during their pre and post natal periods, the vulnerable period of development. Animals are exposed to CPF during gestation, lactation, after weaning up to early adulthood to analyze the consequences on the exposed offsprings. Two doses of CPF have been used: 1 mg/Kg/day the oral maternal and developmental No Observable Adverse Effect Level (NOAEL) (cochran food chemical 1995) and 5mg/kg/day the threshold for induction of effects on neonatal development and maternal toxicity (slotkin brain res bull 2007) (MaurissenToxcisci 2000.) Different parameters have been analyzed such as sex ratio, body weight, size, penis and histological aspect of gonads.

Material and Methods

All experiments were performed according to a protocol approved by the Animal Care and Use Committee at Jules Verne University of Picardie (Amiens, France, Ref# 2011/A/1protocol number 291112-19) and all animals were treated according to guidelines approved by the European Communities Council (2010/63/EU)

- **Chemicals** : Chlorpyrifos (99.8% pure ; LGC standards SARL, Molsheim, France) was dissolved in commercially available organic oil, rapeseed oil (as vehicle). The lower dose was selected on the basis of no observed adverse effect level (NAOEL), as determined in previous studies (Breslin et al 1996 and Marty et al 2012). The higher dose selected represented the threshold of induction of effects on neonatal development and maternal toxicity (Slotkin brain res bull 2007, Gùney et al 2007 hum exptoxicol, MaurissenToxcisci 2000). All the other biochemicals were obtained from Sigma Aldricht (Saint Quentin Fallavier, France).

- **Experimental animals** : Thirty adult Wistar rats (10 males and 20 females)

8 weeksold body weight 250-300g were procured from the society JANVIER LABS (Route des chênes secs – BP 5 53940 Le Genest-Saint-Isle, France).

Upon reception, the animals are weighed and acclimatized to the conditions of the health unit (temperature : 23 °c ; Artificial light cycle of 12h, illuminated phase from 07:00 to 19:00) as well as the habits of the manipulator for seven days. They were fed a standard pellet diet, with tap water available ad libitum.

After a week females are then acclimated to Gavage. They are gavaged once a day at a fixed time with a water volume of 1 mL/kg. It is carried out daily and at fixed time by means of a droguage cannula, right with an oval end (Drencher ; reference 061310 ; 18 Gauge ; 1.2 x51 mm).

After a week of adaptation to the gavage, males and females are put in contact: one male for two females, in order to obtain a mating. Bi daily vaginal smears are performed in the female rats to verify the presence of sperm to confirm the certainty of coitus. In this case the female was isolated and was considered to be in its first half-day of Gestation. After fertilization, the females were individually housed in plastic cages and randomly assigned to three groups : 2 exposed group (CPF1, CPF5) and 1 control group.

From gestational day to the delivery, pregnant rats were gavaged according to the status of the group CPF, at a dose level 1mg/kg/day for CPF1 and 5mg/Kg/day for CPF5 groups, the third CPF0 control group received the same amount of only oil solution.

After delivery females are gavaged during the lactation phase (until D21), following the same protocol as for the *In utero* phase, the pups are then considered to be exposed to pesticides via lactation.

After weaning at Post Natal Day 21 (D21) the newborn and mothers were separated. The newborns were weighed daily and gavaged with the same doses until Post Natal Day 60 (D 60 i.e.early adulthood)

Females are sacrificed on the day of weaning their pups. The pups are sacrificed at three different ages for each litter: the first third of the litter at D0 (day of delivery), the second to D21 (weaning day), the last third at D 60 (60 days after birth). Each third is made up of as many males as females as much as possible.

Table 1 : Table of sacrifices

PUPS	Male n=105	Female n= 103	Total n= 208
Delivery	34	38	72
D21	33	32	65
D60	38	33	71

Each animal is measured, weighed and the organs, penis, ovaries, testis, thyroid epididymis, deferens tubes, seminal vesicles, prostate were collected, fixed individually in formaldehyde solution before included in paraffin for histological analysis. Five microns thick paraffin sections were stained with Hematoxylin-eosin for examination by light microscopy

- **Statistical analysis** : Quantitative data was studied statistically using the Statview 4 ® Software. The sex ratio is compared with the Chi-2 Test. For the remainder, the tests used are non-parametric tests because of the size of the samples. The comparison of the three groups : control, CPF1 and CPF5 was achieved through the Kruskal-Wallis Test. When the result of the Kruskal-Wallis test is significant ($p < 0.05$), non-parametric comparison tests of two mean are performed (Mann-Whitney tests). The threshold of significance retained is $P < 0.05$. The indicative results ($0.05 < P < 0.10$) are given if they are considered relevant. The results are given in the form of mean \pm standard deviation.

Results

- **General Results** : Number of newborn : 18 females were fertilized and 6 litters were obtained in each group (18 in total). In total : 259 pups (Table1) 86 for CPF1, 80 for CPF5 and 93 for control

No deaths were observed among any groups

-Sex ratio : Although sex ratio reverses with chlorpyrifos (predominance of females in control vs male dominance in exposed groups), there was no significant difference between the control group, CPF1 and CPF5 ($\chi^2 = 2.28$; $p = 0.32$).

	Control CPF0		CPF1mg		CPF5mg	
Pups (n)	93		86		80	
Females / Males	50	43	37	49	38	42
% Females / Males	53,76%	46,24%	43,02%	56,98%	47,5%	52,5%
Number of pups (mean)	15,5		14,33		13,33	

Tableau 2 : sex ratio analysis

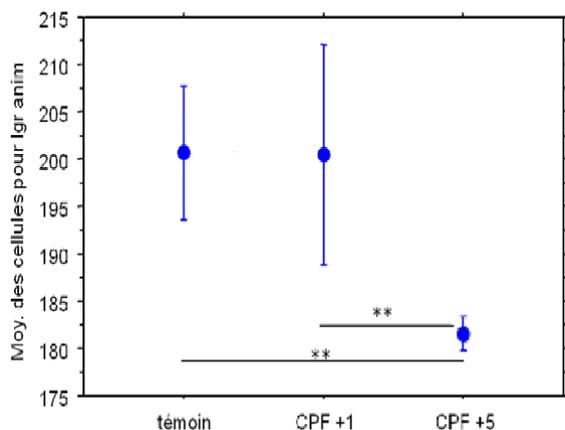
At the delivery day : there was no difference for the body weight and size between the three groups.

- **Results for the Male pups :** The mean body weight of the pups exposed to Chlorpyrifos CPF1 was statistically different from the body weight of the control CPF0 (D21 : $h = 9.723$, $p = 0.008$; at D60 : $h = 9.865$, $p = 0.007$).

The body weight of CPF + 5 pups were significantly lower than controls (D21 : $Z = 2.944$, $p = 0.003$; D60 : $z = 2.652$, $p = 0.008$) and CPF + 1 (J21 : $z = 2.740$, $p = 0.006$; J60: $Z = 2.646$, $p = 0.008$)

Table : weight

The size The mean size of rats at D21 ($H = 8,899$, $p = 0,012$) was significantly lower for the CPF+5 vs control ($Z = 2,951$, $p = 0,003$) and CPF1 ($Z = 2,649$, $p = 0,008$) (Fig. 1 et 2).



* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$

Fig 1 : size of the pups

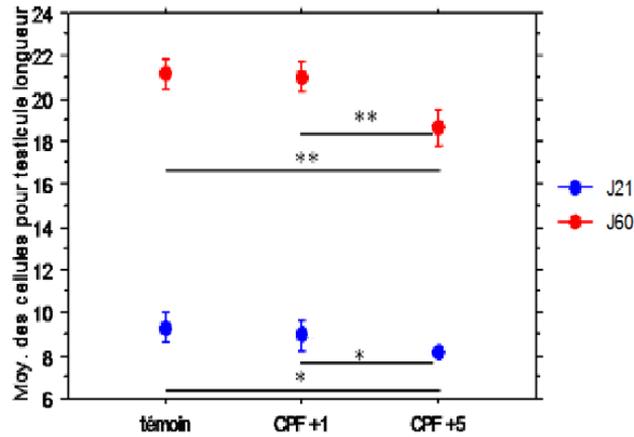


Fig 2 : CPF5 rat (on left) and control (on right) at D60

- Testes analysis

▪ Testicular size

The testis at D21 ($H = 8,339$, $p = 0,0155$) and D60 ($H = 8,973$, $p = 0,011$) were significantly smaller (longitudinal axe) in CPF+5 than in the control group (D21 : $Z = 2,445$, $p = 0,015$; D60 : $Z = 2,658$, $p = 0,008$) and CPF+1 (D21 : $Z = 2,305$, $p = 0,021$; D60 : $Z = 2,658$, $p = 0,008$) (cf. Fig. 3).



* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$

Fig 3 : testis length (mm) at D21 (blue) and D60 (red)

- *Mean length of right testis*

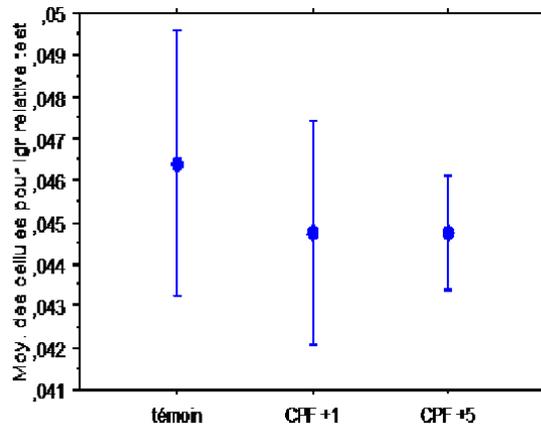
At D60 the mean length of the right testis of CPF5 was a little lower than those of the control group ($H_2 = 5,981$, $p = 0,0448$) vs ($Z = 1,855$, $p = 0,064$). It was significantly lower than CPF1 ($Z = 2,289$, $p = 0,022$).

- *Mean length of left testis*

At D60 ($H_2 = 10,091$, $p = 0,006$) the length was significantly lower for CPF+5 vs control group ($Z = 2,708$, $p = 0,007$) and CPF+1 ($Z = 2,702$, $p = 0,007$).

- *Relative length of the testis (testis length/size of the animal)*

At D21 ($H = 2,083$, $p = 0,353$), there was no difference between the 3 groups

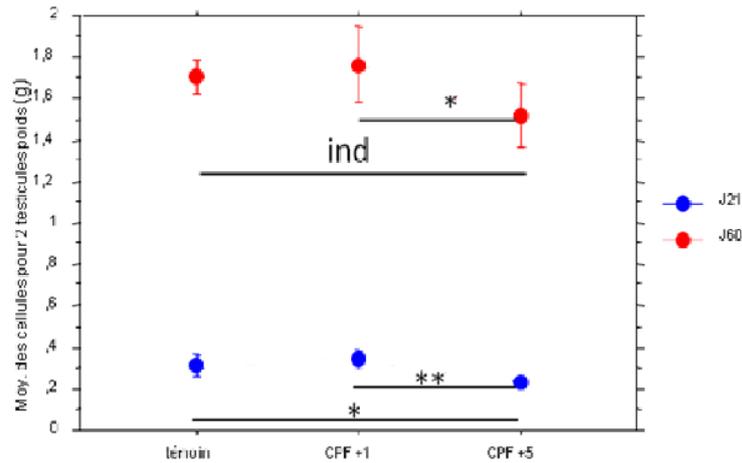


(Fig. 4). relative length (mm) of testis at D21

- *Testis weight*

The mean weight of the 2 testis of each animal at D21 ($H = 9,953$, $p = 0,007$) was significantly lower for the CPF+5 than the control and CPF1 groups ($Z = 2,497$, $p = 0,013$) et CPF+1 ($Z = 3,033$, $p = 0,002$).

At D60 it was indicative between CPF5 ($H_2 = 4,971$, $p = 0,083$) vs control group ($Z = 1,890$, $p = 0,0588$) and CPF1 ($Z = 1,989$, $p = 0,047$)



(cf. Fig. 5). *Testicular mean weight (g) at D21 (blue) and D60 (red)*

*ind : $p < 0,1$ * : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$*

- *The mean weight of right testis at D60* ($H_2 = 7,148$, $p = 0,028$) was significantly lower in CPF+5 than in the controle group ($Z = 2,652$, $p = 0,008$) and CPF+1 ($Z = 2,079$, $p = 0,038$).

- *The mean weight of left testis at D60* did not differ ($H_2 = 2,898$, $p = 0,235$) in the 3 groups.

There was no difference between the relative testicular weight (weight of testis/size) at D21 ($H_2 = 4,096$, $p = 0,129$) and D60 ($H_2 = 3,901$, $p = 0,142$) in the 3 groups

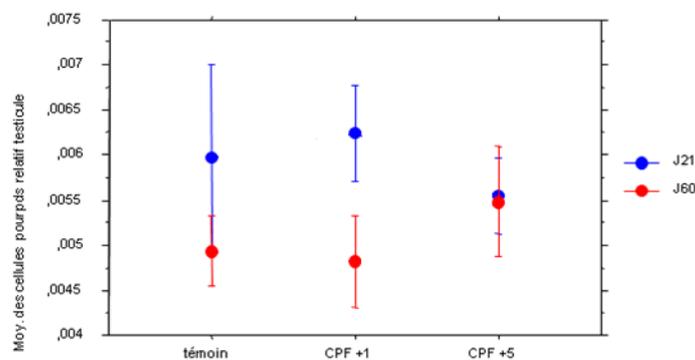


Fig 6 : testicular relative weight (g) at D21 (blue) and D60 (red)

- **Penis analysis**

no macroscopic abnormality was observed

▪ *Penis length :*

The mean length at D21 in CPF5 ($H_2 = 7,169$, $p = 0,028$) was statically lower than in CPF5 vs control group ($Z = 2,645$, $p = 0,009$) and CPF+1 ($Z = 2,352$, $p = 0,019$).

At D60 we had not observed any difference : ($H_2 = 2,169$, $p = 0,338$)

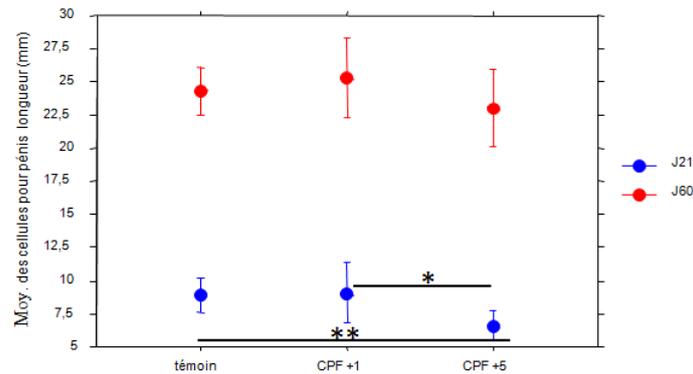


Fig. 6 *penis length at D21 (blue) and D60 (red)*
 * : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$

▪ *Relative size of the penis*

There is no difference at D21 between the 3 groups J21 ($H_2 = 3,660$, $p = 0,160$) (cf. Fig. 22).

Penis weight :

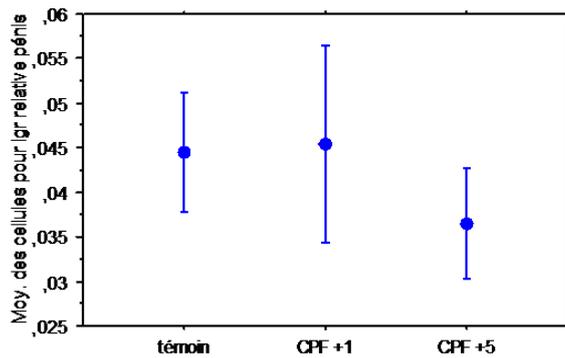


Fig 7 : *Penis relative size at D21*

▪ *Penis weight :*

At D21 in CPF5 the weight of the penis was significantly lower ($H_2 = 8,635$, $p = 0,013$) than in the control ($Z = 2,717$, $p = 0,007$) and CPF1 ($Z = 2,079$, $p = 0,038$).

At D60 there was no difference in the three groups : ($H_2 = 3,127$, $p = 0,209$)

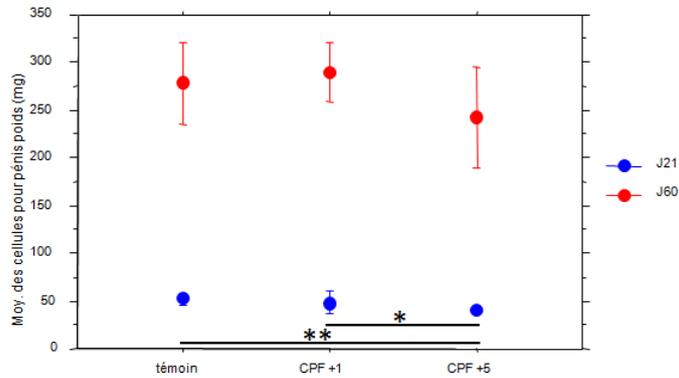


Fig. 8 *Penis weight at D21 (blue) and D60 (red)*
 * : $p < 0,05$ ** : $p < 0.01$

▪ *Penis relative weight* did not differ at D21 and D60 in the 3 groups

Microscopic analysis

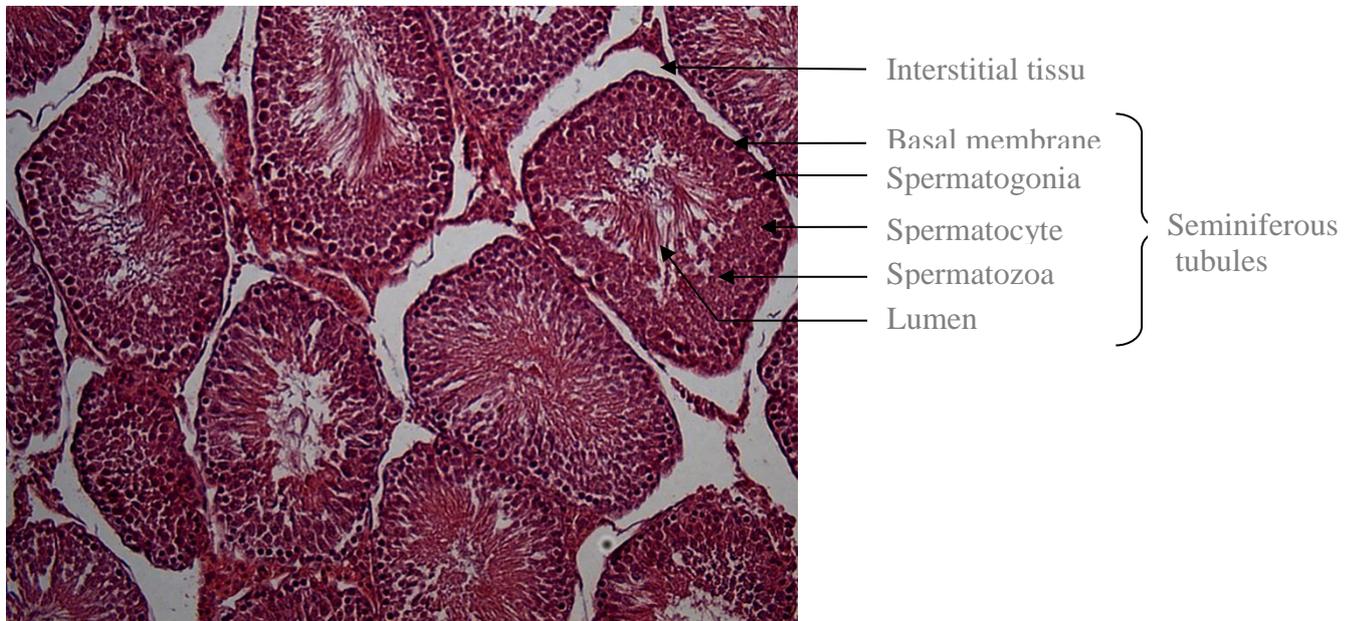
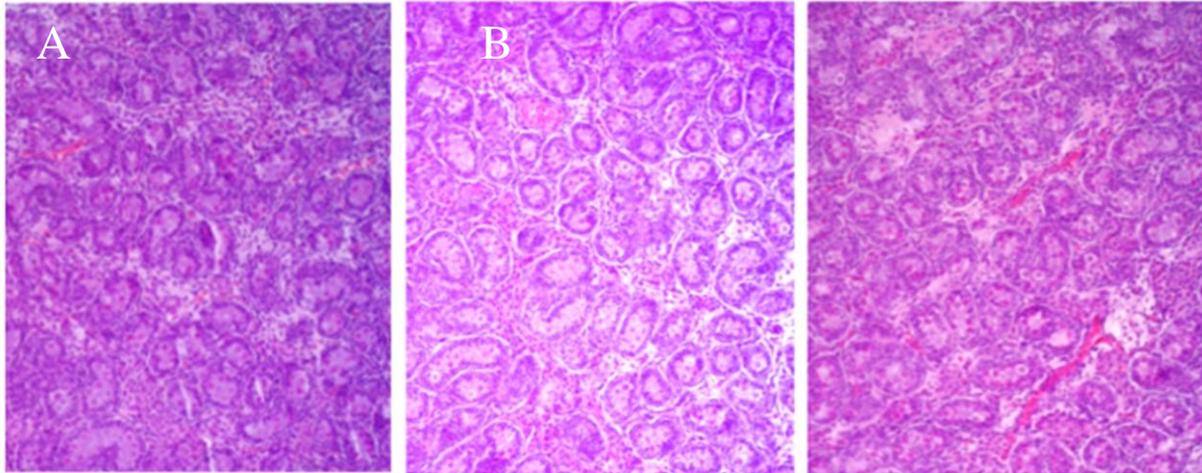


Fig 9 : *Histologic aspect of testis of control group at D60*

	Microscopic Results
Control	Normal testicular Histology
CPF1	Normal testicular histology
CPF5	Mild dysorganisation of the tissu with congestion in blood vessels

Table 3 :histological analysis of testis at J0



A/control

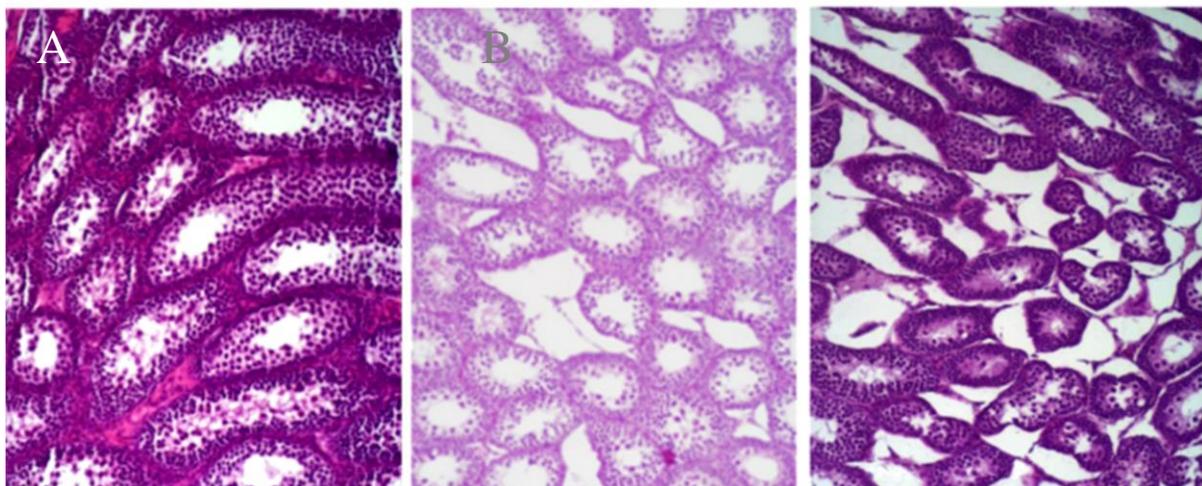
B/ CPF1

C/ CPF+5

Fig 10 : At D0 of delivery

	Testicular Histology
Control	Normal testicular histology
CPF1	Mild dysorganisation of the tissu. The seminiferous tubules appeared wider and more separated
CPF+5	Irregular aspect of the seminiferous tubules with alteration of the germinal epheliuma. Modification of the interstitial areas

Table 4 : Testicular Histology at D21



A/ Témoin

B/ CPF+1

C/ CPF+5

Fig 11 histological aspect of testis

	Histological analysis
Control	Normal testicular histology with all successive stages of spermatogenesis with spermatozoa in lumen
CPF1	Mild changes in spermatogenic cells
CPF5	Irregular seminiferous tubules, changes in spermatogenetic cells, congestion in blood vessels

Table 5 Histological results at D60

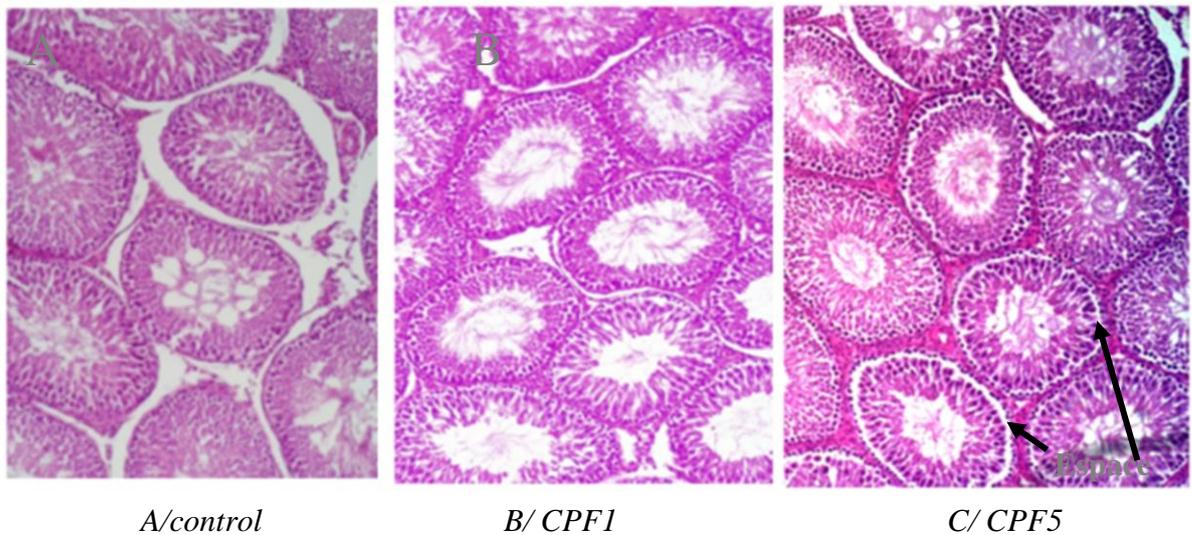


Fig 12 : Hstological aspect at D60

- **Results For the female pups**

Female pups' bodyweight were significantly different at D21 and D60 depending on the level of exposure (D21 : $H_2 = 12,098$ $p = 0,002$; D60 : $H_2 = 10,263$ $p = 0,045$).

At D21 the body weights were significantly lower for CPF5 females (D 21 : $36,343 \pm 3,521$ g ; D60 : $174,500 \pm 13,435$ g) than in control (D21 : $51,886 \pm 5,069$ g, $Z = 3,024$, $p = 0,0025$; D60 : $210,250 \pm 20,132$ g, $Z = 2,191$, $p = 0,0285$) and CPF +1 (D21 : $55,785 \pm 7,215$; $Z = 2,910$; $p = 0,0036$ /D60 : $232,556 \pm 25,623$ g ; $Z = 2,121$; $p = 0,0335$)

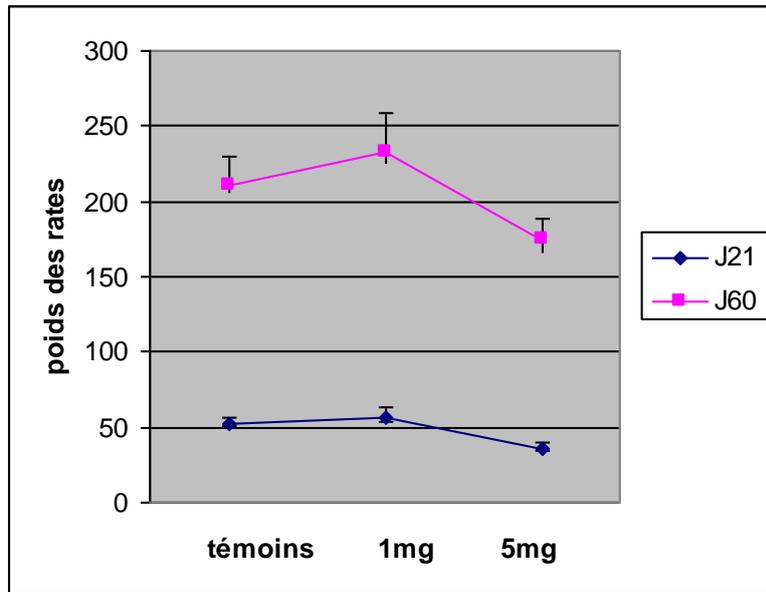


Figure 13 : female pups weight (g) at D21 for control, CPF+1 et CPF+5

. * : $p < 0,05$; **

▪ Female size

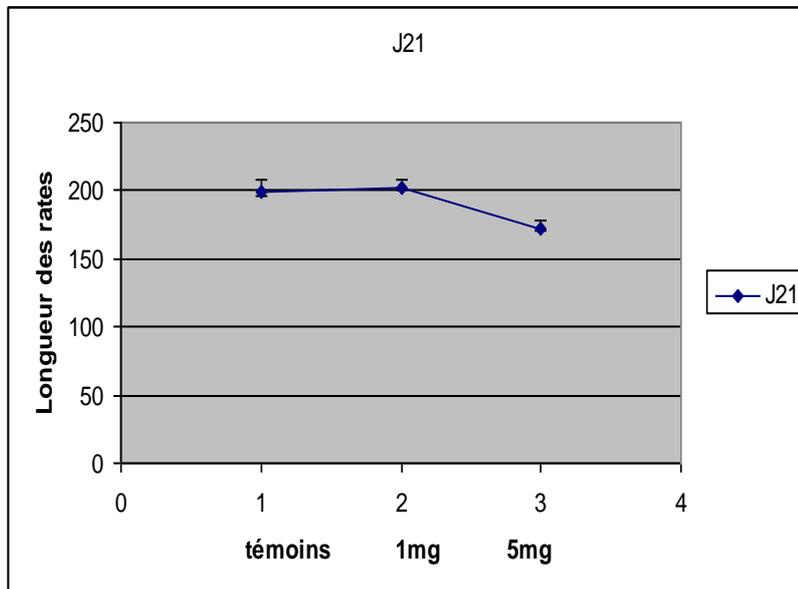


Fig 14: pup's size(mm) at D21

At D21 (cf.fig 14) there was a significant difference between the animals depending on the level of the exposure to the CPF ($H = 10,263$ $p = 0,045$). The CPF size were lower (172 ± 6 mm) than in control (199 ± 7 mm; $Z = 3,024$; $p = 0,0024$) and CPF1 (202 ± 9 ; $Z = 2,910$; $p = 0,0036$) groups.

- *Ovary weight*

- a) Absolute ovary weight

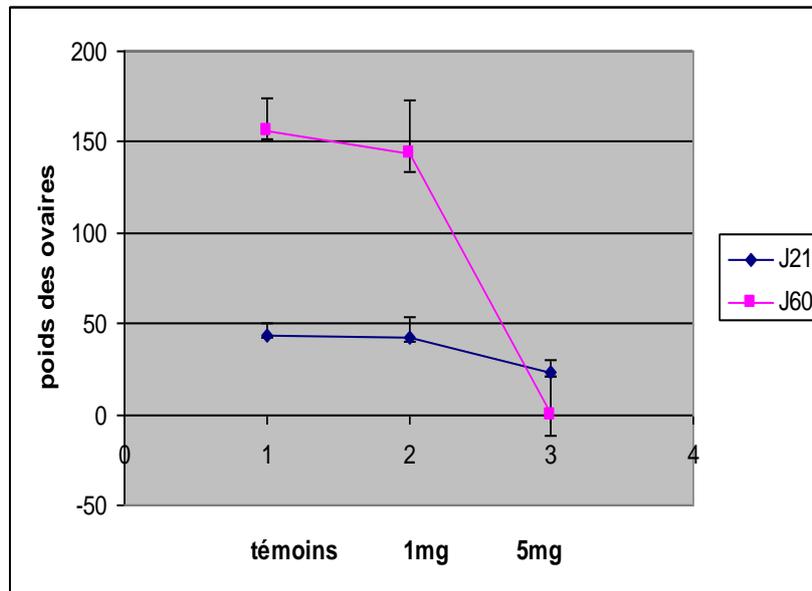


Fig15 : ovary weight (g) at D21 and D60 in control, CPF1 and CPF5 groups

At D21 and D60 (fig.15) the ovary weights varied indicatively depending on the level of CPF exposure ($H_2 = 5,331$ $p = 0,0696$).

At D21 the ovary weight was significantly lower in CPF5 cases ($23,727 \pm 5,800g$) than in the control group ($43,981 \pm 6,589g$; $Z = 3,024$; $p = 0,0025$) and CPF1 ($42,886g \pm 11,106g$; $Z = 2,789$; $p = 0,0053$) groups.

At D60, the CPF exposure seemed have an significantly impact on the ovary weight ($H_2 = 8,870$ $p = 0,0119$). In CPF5, it was significantly lower ($116,667 \pm 20,817g$) vs controle ($156,250 \pm 17,464g$; $Z = 2,404$; $p = 0,0132$) and CPF1 ($143,333 \pm 30,000g$; $Z = 1,664$; $p = 0,891$).

b) Relative ovary weight (ovary weight/body weight)

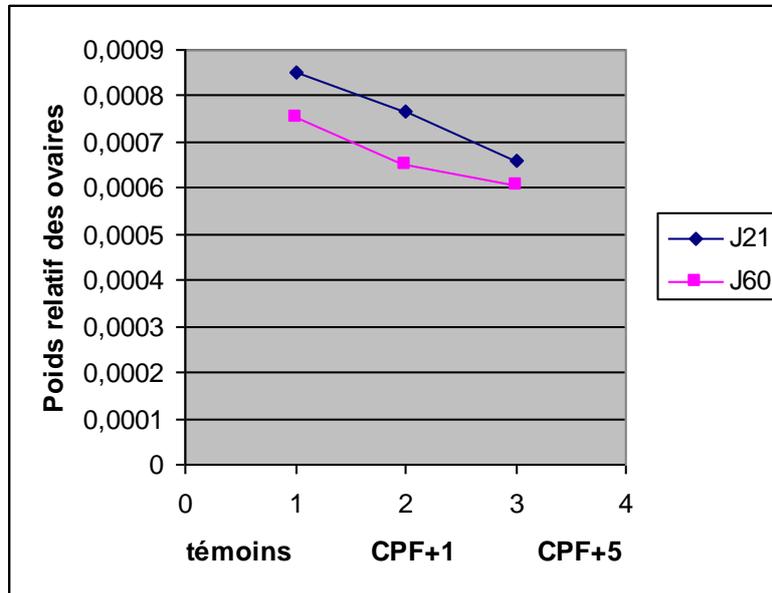


Fig 16: relative ovary weight (g) at D21 in control, CPF+1 and CPF+5

At D21 (fig. 4) the relative ovary weight varied indicatively depending on the CPF level of exposure (H_2 5,331 $p = 0,0696$). The relative ovary weight was indicatively lower for CPF5 ($0,0007 \pm 0,0002g$) and CPF1 ($0,0009 \pm 0,0001g$; $Z = 1,678$; $p = 0,0934$) groups were vs control group ($0,0009 \pm 0,0001$; $Z = 1,890$; $p = 0,0588$). There was an early impact from the low dose of exposure but this effect did not increase significantly for CPF5

At D60 the relative ovaries (fig 4) were statistically different depending on the exposure level to CPF ($H_2=8,870$ $p=0,0119$). It was lower for CPF5 ($0,0006 \pm 0,0001$) vs the control group ($0,0008 \pm 0,0001$; $Z = 1,826$; $p = 0,079$) and CPF1 ($0,0006 \pm 0,0001$; $Z = 0,471$; $p = 0,0639$)

▪ *Ovary Histological analysis*

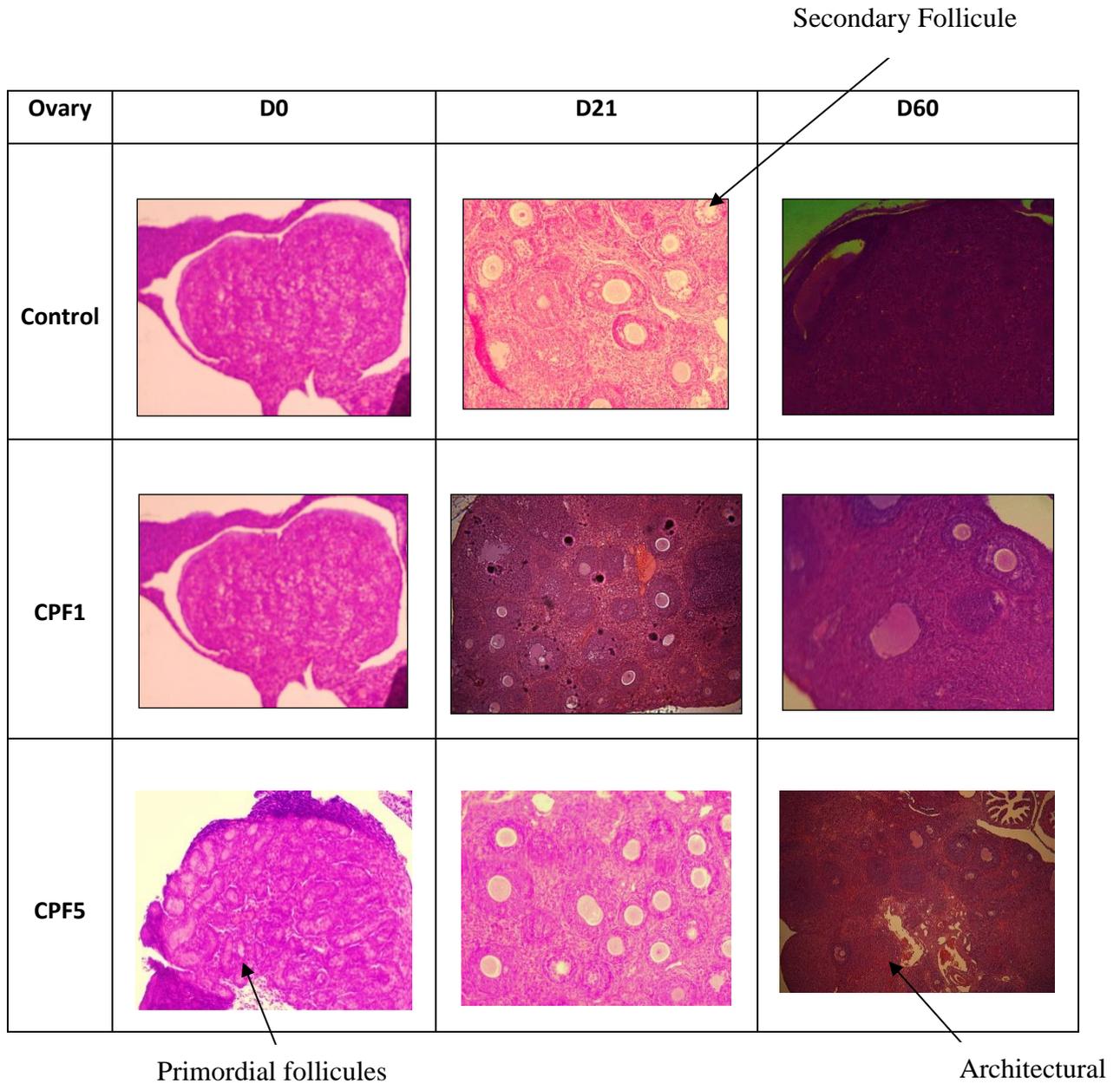
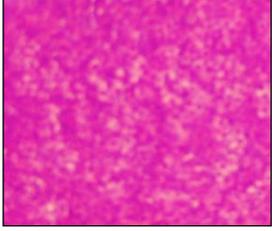
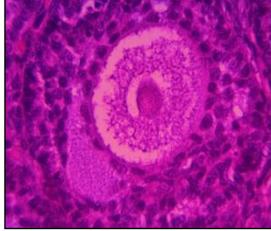
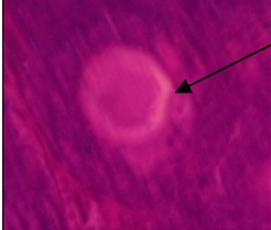
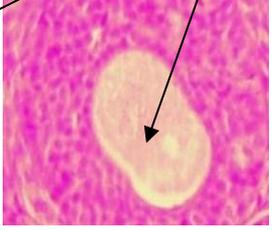
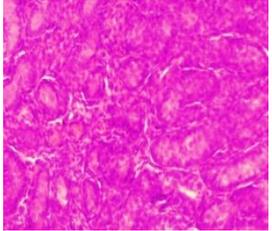
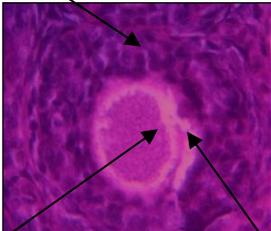
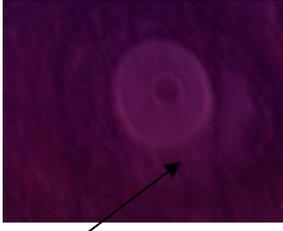


Fig 17 Ovary histological analysis (GX10)

At D0 there was no difference between the control, CPF1 and CPF5 groups at this stage the pups were not adult.

At D21 primordial and secondary follicles appeared. We observed more secondary follicles in the control group than in CPF1 and CPF5 with a degree of atresia in CPF5 and a clear Halo surrounded translating probably a trouble of the folliculogenesis.

AT D60 ovary parenchyma was altered in CPF5 and we observed granulations in cells

Ovary	D0	D21	D60
Control			
CPF1			
CPF5			

Ovary Histological analysis (GX40)

At D21 and D60, there were changes in folliculogenesis and theca cells with fibrillar aspect principally in CPF5. For CPF1 and CPF5 we observed a clear halo between the oocyte and the corona radiata.

Discussion

Organophosphorus pesticides are among the most widely used pesticides particularly in Picardie. We have previously proved that chlorpyrifos could be detected in meconium of human newborn (Haraux) and have an impact on apnea and contractibility of ileal muscles (Jerome et al.). We have administered 1 mg/kg/day or 5 mg/kg/day at this level (NOAEL) accordingly with the international publications we have not observed maternal toxicity or death. In toxicity studies it is well known that the variation in body and organ weights are significant indicators for the evaluation of toxic impact of chemicals (Andersen 1999, Bailey 2004, Kim 2004). For Zidan (2009) reproductive organ weights are a good indicator of reproductive toxicity.

A lot of publications present results on CPF toxicity but the level of exposure are very often higher than NOAEL level. We observed an increase of female pups number vs male pups but it was not significant and no sex ratio studies of chlorpyrifos-exposed rats have been found in the literature.

For the male pups in our study, the weights and lengths of the rats treated with 5 mg / kg/day were significantly lower than in the control group and CPF1, either at D21 or D60. It is the same with regard to the length of the testis and their average weight. The penis length is significantly lower in the CPF5 group, compared to CPF1 and control group only at D21. No significant difference could be found for the three groups at day 60. Chlorpyrifos may induce delay for penis growth without affecting its final size.

Frag, in 2010 [16] fed mice with 99.2% pure CPF solution. Food consumption was significantly reduced in the 25 mg / kg-d group resulting in a significant decrease in male weights in this group. Absolute and relative weights of the reproductive organs (testes, epididymides, tail of the epididymis, prostate and seminal vesicles) are dramatically reduced in the 25 mg / kg-d group.

Akhtar showed in 2009 [17] that chlorpyrifos, at a dose of 9 mg / kg-d, does not change the weight of vital organs, with the exception of the adrenal glands, whose weight increases. On the other hand, he observed a decrease in testicular weight for these animals.

In 2007, Joshi [18] showed that chlorpyrifos at doses of 7.5-12.5-17.5 mg / kg-d did not significantly alter the body weight of rats, but resulted in a significant decrease in testes weight in the three groups.

Concerning testes weight, our results are consistent with those of these three studies. On the other hand, our results and those of Joshi on the body weight of the rats are contradictory but this could perhaps be explained by the fact that the rats were exposed only in post-natal.

Our testes histological analysis showed testicular damage. In the group CPF5 at D0, we observed dilated blood vessels. At D21 we find architectural changes in seminiferous tubules in the CPF1 group and even more so in the CPF5 group. Finally, at D60, there is a clear space separating the cells of the spermatic line translating a disorder of the continuity of the germinal epitheliuma. These abnormalities of spermatogenesis could affect fertility.

Farag [16] observed slight changes in testicular germ cells, oedema, irregularity and separation of seminiferous tubes in CPF5 compared with the control group. The seminiferous tubules appear larger and more spaced apart due to blood vessel congestion due to accumulation of edema in the medium and high dose groups of 15 and 25 mg / kg/day of chlorpyrifos. Germ cell degeneration is also noted in the mid and high dose groups. Exposure to chlorpyrifos appears to induce a significant decrease in testicular weight, with a change in testicular architecture and moderate to severe interstitial enlargement depending on doses of ingested chlorpyrifos (15 and 25 mg / kg/d). Reduction of testicular weight could be used as a sensitive parameter to interpret male gonadal toxicity (dutta et al 2013)

Joshi [18], observed that chlorpyrifos at 17.5 mg /kg/day would cause reproductive effects through alterations in spermatogenesis (spermatic maturation arrest) in male albino rats and severe testicular damage.

Sai (2014) observed that CPF administred orally to male rats at 2.7, 5.4 or 12.8 mg/kg/day no impact on the body weight. Moreover, he did not find the testicular weight decrease. But described a significantly impaire of sperm quality with an CPF exposure of 5.4 and 12.8mg/kg/day

For Peiris et al (2017) their results indicate that CPF causes reduction in sperm concentration, motility and testes weights. Their results are comparable with Joshi and our results. He shown also a decrease of FSH, LH, and testosterone concentrations in CPF exposed rats accordingly with the results of SAI 2014, Shittu 2013, Zidan 2007. The impact of CPF exposure on GnRH gene expression and GH was demonstrated by Cole and al (2011). In his study CPF could inhibited Acethyl choline Esterase activity which interferes with neuro transmission, inducing FSH or LH releasing or supression (Kokhar et tyndale 2012. LH target Leydig cells to produce testosterone, so CPF exposure may cause oxydative damage of these cells leading reducing testostérone secretion (Silmen 2014). The decrease of LH level may exert a pervasive effect on leydig cell inducing a decrease of testosterone levels. Moreover CPF irreversibly inhibits CYP3A4 thus inhibiting 3-Hydroxycarbofuran in human liver microsomes leading an activation of testosterone metabolism (Usmani et al 2004)

Increased sperm abnormalities indicate the possible cause of reduced fertility of sperm (peiris and moore 2001a). Both increased sperm morphology and motility density of CPFexposure may induced a decrease of pregnancy rate 5hekal 2014)

It would be appropriate later to make a statistical study of the testicular histology. Using an image analyzer, a morphometric count of the seminiferous tubes would specify the histological alterations.

An immuno-histochemical study could be carried out to find out whether the clear space appeared in the germ cells is due to an abnormality of intercellular junction proteins or germ cell degeneration. These abnormalities could be analyzed according to the testosterone level of each animal on the samples preserved during the study.

For female pups there is less data in litterature. The body weight decreases in CPF5 group. These results are comparable to other studies which have found a significant decrease in the weight of first-generation rats with different CPF exposure protocols.

Jeong S. H et al. [16] investigated the impact of early and chronic exposure to the CPF on first-generation rats. Exposure of 1st generation (male and female) rats was related to the Transplacental passage during gestation and later lactation. The weight of 1st generation rats exposed to 100mg/kg/day was significantly reduced compared with other groups and control.

It was similar for the relative and/or absolute brain, ovary, liver, spleen kidneyweight weight. It has also been shown hypothyroidism. At the dose of 10mg / kg, only the parents were affected, the weight of their adrenal gland then increased.

Greenlee et al. [17] tested 3 insecticides including CPF, and 2 fungicides. The effect on embryonic pre-implantation of the mouse was studied. Groups of 25 embryos were incubated for 96 hours in vitro, each with a chemical agent alone or a mixture of pesticides at the doses to which the general population is exposed. Chlorpyrifos was present at 0.003 µg / L in their environment. A decrease in the development of the blastocyst was noted as well as a decrease in the number of embryonic cells. This could explain the smaller weight found at birth and even that of the organs found by Sang-Hee Jeong. [18]

We found a significant decrease in the absolute ovary weight of the female rats in the 5 mg / kg group, in the relative ovary weight at 5 mg / kg but also at 1 mg / kg. There is therefore an effect at low doses that does not increase significantly to 5mg. Other studies have found a significant decrease in the weight of first-generation ovaries with different CPF exposure protocols such as Sang-Hee Jeong study but for much higher doses. [18]

Indeed, Sang-Hee Jeong highlighted in the previously detailed study the decrease in absolute and relative ovary weight a dose of 100 mg / kg / day but not at a dose of 10 mg.

In an another protocol, Breslin et al. [19] studied the effects of CPF intoxication in rats (G0) at 3 doses: 0 mg, 0.1 mg, 1.0 mg, and 5.0 mg / kg / day by oral gavage and the following two generations. Sprague-Dawley rats were CPE-addicted from day 6 of gestation to day 15. A significant decrease in cholinesterase levels in plasma erythrocytes was observed (at a dose of 1 mg) in G0 rats. Histological alterations were also visualized in the area adrenal (at 5.0 mg).

This alteration was characterized by the presence of vacuoles in the fasciculata zona. Since the adrenal is an organ secreting androgen, these findings suggest that these changes may have a functional impact, particularly on the secretion of sex hormones. No effects on reproductive function or fertility were found in this study regardless of dose.

Yoshida M. [20] shown that each morphological alteration during the follicular cycle might have an impact on the ovarian function and result in an alteration of the reproductive functions of the female.

Tetradifon, an organochlorine pesticide, is also widely used in the treatment of plants. It disrupts folliculogenesis and decreases sex hormone levels at oral doses of 28 mg/kg/day in adult rats [21]. Other abnormalities such as increasing number of atretic follicles or decreasing diameter of mature follicles have been identified.

Nishi and al (2013) exposed female Wistar to CPF at 0.1mg and 2.5mg/kg. They did not find changes in the body weight, the net body weight gain, and feed intake. But a significant difference was observed in estrous cyclicity with decreasing growth rate ($p < 0,05$) in lower dose group ($0.802 \pm 0,245g$) as compared to control ($2,088 \pm 0,613g$). There was no difference for the dose group vs control. The microscopic analysis showed hypertrophy in ovarian surface epithelium with a significant increase of the height in both treated groups. The primary follicular diameter exposed to low dose was higher than control. The diameter pre-antral follicles was higher in 2.5 mg/kg dose exposure than the control. Similarly, a significant increase in the antral follicular diameter was observed in the both groups. Follicular atresia was increased in treated groups. The histological changes observed in ovary might be associated with the expression of estrogen receptors in the gonads due to estrogenic properties of CPF. It might be responsible for increased ovarian epithelium height and follicular diameter in treated group

Previously, we have found in women a correlation between the granular morphological aspect of oocyte retrieved for Assisted reproductive cycle and the exposure of pesticides in Picardie (merviel and al)

In perspective, it would be interesting to check whether the macroscopic and microscopic changes observed in this study induced by the CPF exposure could impact the reproductive and hormonal functions in case of chronic perinatal exposure.

Conclusion

The present data demonstrate that chlorpyrifos can produce adverse effects on pups development through a significant decrease of body weight, size, testicular weight, ovary weight and induce testicular and ovary changes particularly with the CPF5 group. These results suggest that chlorpyrifos exerts toxic suppressive effects on testicular and ovarian functions. These defects impact reproductive function in rat but similar consequences in humans still need to be explored

***TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET
PERSPECTIVES DE RECHERCHE***

Les principaux éléments de discussion ont été présentés dans la partie précédente dans les articles correspondants à nos thématiques de travail : Impacts du Tabagisme et des

Pesticides sur la fertilité.

Nous proposerons ici une synthèse des résultats à l'issue des différents travaux réalisés, éclairée d'éléments de la littérature ainsi qu'une présentation des prochains travaux qui seront menés dans la continuité de ceux qui vous ont été présentés.

I. THEMATIQUE IMPACT DU TABAGISME SUR LA FERTILITE

1. Le tabac, un facteur de risque d'infertilité

Dans la population de patientes issues du PHRC, les femmes infertiles étaient plus fréquemment fumeuses que les femmes fertiles. Le nombre d'années de tabagisme n'était pas différent entre les deux groupes quand les femmes étaient fumeuses. Si nous regardons le nombre de cigarettes fumées par jour, les patientes fertiles fumeuses fumaient davantage quantitativement que les patientes infertiles. Notre étude montre d'autre part que le tabagisme passif était significativement différent entre les groupes de femmes fertiles et infertiles, et ce, à tous les âges explorés (enfance, adolescence et âge adulte), ce qui semble attester d'une toxicité marquée du tabac même en cas de consommation passive.

Côté masculin, nous n'avons pas retrouvé de différence d'exposition au tabac entre les hommes des groupes fertile et infertile en dehors du tabagisme passif dans l'enfance, l'adolescence et à l'âge adulte.

2. Le tabac, en cause dans la baisse de la réserve ovarienne

Aussi bien l'étude observationnelle menée que l'étude prospective du PHRC n'ont permis de mettre en évidence d'altération de la fonction ovarienne chez nos patientes or que celle-ci a été assez largement décrite par de nombreux auteurs [36, 42, 48, 49]. Il est possible que l'âge féminin limite fixé dans nos études à 35 ans afin de ne pas mettre en cause l'âge dans l'altération de la réserve ovarienne puisse être mis en cause. En effet, le tabac pourrait être à l'origine d'une insuffisance ovarienne prématurée qui ne se révélerait que dans une tranche d'âge de 35 à 40 ans.

Le fait que nous ayons pu mettre en évidence une majoration de la proportion d'infertilité secondaire chez les patientes fumeuses va dans le sens de cette diminution de la fertilité spontanée dans cette population. Il serait donc intéressant d'apprécier l'évolution de la réserve ovarienne de manière prospective chez des fumeuses et non fumeuses à différentes tranches d'âge de la vie (avant 30 ans, entre 30 et 35 ans, entre 35 et 40 ans et après 40 ans).

3. Tabagisme et paramètres des tentatives d'AMP

Dans l'étude rétrospective avec analyse de 110 tentatives de FIV, nous avons mis en évidence une diminution du nombre de « top embryos » chez les femmes fumeuses. Leur âge jeune avait permis un nombre suffisant d'embryons de bonne qualité pour permettre la réalisation d'un transfert embryonnaire, ce qui n'impactait pas les taux de grossesse, soulignant l'intérêt de prendre en charge les taux cumulatifs de grossesse (transferts d'embryons frais et congelés issus d'une tentative). Les résultats de l'analyse du PHRC n'ont pas permis de confirmer cette observation.

Sur ce point, la littérature est également partagée. Le nombre d'ovocytes recueillis [46, 50], le pourcentage d'ovocytes matures [50] et la morphologie ovocytaire [52] sont pour certains auteurs atteints en cas de tabagisme féminin. Les taux de fécondation et de développement embryonnaire semblent être différemment impactés comme nous l'avons également objectivé. Pour certains auteurs, ils sont meilleurs chez les fumeuses [50, 51, 53]. D'autres auteurs [51, 54] ont, quant à eux, retrouvé une altération de la qualité embryonnaire en cas de tabagisme féminin.

Selon Zenzes [44], la nicotine et la cotinine inhiberaient l'apoptose de certaines lignées cellulaires. L'inhibition de l'apoptose contribuerait à favoriser le développement d'embryons porteurs d'anomalies. Ainsi, l'auteur retrouve une meilleure qualité embryonnaire (Grade I et II), lors de l'analyse morphologique des embryons J2/J3 chez les fumeuses. Ces résultats suggèrent que la consommation de tabac confère aux embryons exposés une certaine résistance à la fragmentation. Le tabac favoriserait alors la survie des embryons (évalués comme étant de « bonne qualité morphologique ») avec pour conséquence le remplacement dans l'utérus maternel d'embryon type I et II mais probablement porteurs d'anomalies génétiques. Ce phénomène pourrait être une des causes des fausses couches précoces retrouvées chez les fumeuses.

Les auteurs ne retrouvent pas tous de différence des taux de grossesse en cas de tabagisme féminin mais ils s'accordent pour retrouver une diminution des taux d'accouchements [58], liés à une augmentation des grossesses extra-utérines par atteinte tubaire [34, 58, 60] et une augmentation des fausses-couches, mis également en évidence en cas de tabagisme passif [61].

Dans la littérature, la toxicité du tabagisme sur la fertilité masculine est bien documentée et son impact reconnu sur la numération [63, 64, 65], la mobilité [63] et la morphologie [63, 64, 70, 71] avec des études montrant une amélioration significative de la qualité du sperme trois mois après arrêt de l'intoxication tabagique [67]. Le tabac semble être à l'origine d'une augmentation du stress oxydatif et a été accusé d'être à l'origine d'altérations de l'ADN nucléaire des gamètes [75, 76].

4. Les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires comme marqueurs de l'intoxication tabagique

Les résultats de notre étude ainsi que les données de la littérature sont en faveur d'une bonne corrélation entre les taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires et le nombre de cigarettes fumées par jour par les patientes : les taux de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires sont donc de bons marqueurs du tabagisme des patientes. Nous avons d'autre part pu mettre en évidence que la détection de nicotine ou de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes non fumeuses est liée à leur statut de patientes exposées à un tabagisme passif.

Weiss fut le premier, en 1989, à avoir mis en évidence la présence de cotinine dans le sang (taux de 24 à 245 ng/ml) et dans les liquides folliculaires (taux de 5 à 371 ng/ml) des patientes fumeuses [144].

Dans une étude publiée en 1996 portant sur la recherche de cotinine dans les liquides folliculaires de 111 patientes, Zenzes [145] a retrouvé chez les patientes non fumeuses (50 patientes) un taux moyen de cotinine de 4.2ng/ml +/- 2ng/ml, chez les patientes fumeuses passives (17 patientes) un taux moyen de cotinine de 76.3 +/- 56.5 ng/ml et chez les patientes fumeuses (44 patientes) un taux moyen de cotinine de 710.4 ng/ml +/- 128.2 ng/ml.

Il a ainsi mis en évidence le fait que 84% des patientes non fumeuses étaient en fait exposées à un taux moyen de cotinine de 5ng/ml. Dans cette étude, Zenzes a retrouvé une corrélation positive entre le nombre de cigarettes fumées et les dosages de cotinine dans les liquides folliculaires des patientes fumeuses.

Paszkowski [146] confirme la corrélation entre le statut tabagique des patientes et les taux de cotinine dans leurs liquides folliculaires : chez 10 patientes non fumeuses, il obtient un taux moyen de cotinine dans les liquides folliculaires de 3.71ng/ml (1.2-15.62), celui-ci est de 29.6ng/ml (20.9-45.7) chez les patientes fumeuses passives (25 patientes) et de 285.7ng/ml (62.21-595) chez les patientes fumeuses (10 patientes). Les différences entre les groupes sont significatives ($p < 0.001$).

Plus récemment, dans une étude publiée en 2010, sur une population de 25 femmes fumeuses actives et 132 femmes non fumeuses, Fuentes a retrouvé une corrélation significative entre les concentrations en cotinine dans les liquides folliculaires et le statut tabagique de ces femmes ($p < 0.05$) [147].

En outre, il a été retrouvé de la cotinine, du cadmium et du peroxyde d'hydrogène, tous des composés de la fumée de tabac, dans les liquides folliculaires de femmes fumeuses. Ces composés semblent être à l'origine de troubles de la méiose responsables d'une altération de l'ovocyte. Des études plus fondamentales ont été réalisées comme celle de Paksy [43] qui a isolé les cellules de la granulosa de 41 femmes bénéficiant de FIV. La mise en culture de ces cellules avec du cadmium, dérivé du tabac, a altéré la communication inter-cellulaire et la production de progestérone.

Zenzes [44] a montré par immuno-marquage que la cotinine pénètre dans le noyau et le cytoplasme des cellules de la granulosa et ceci de façon plus importante chez les fumeuses actives que passives. De plus il existe une corrélation fortement positive entre le score d'immuno-marquage et le dosage de cotinine dans le liquide folliculaire. Ces résultats ont été confirmés par Gocze [45]. Dans les cellules de la granulosa de patientes fumeuses ont été retrouvés des adduits de l'ADN. Ces adduits de l'ADN sont le résultat de la liaison à l'ADN des benzo-a-pyrènes, composés issus de la combustion incomplète des dérivés aromatiques contenus, en particulier, dans le tabac.

5. Passage de la barrière hémato-testiculaire des dérivés du tabac et impact sur la gamétogenèse

Certaines substances passent la barrière hémato-testiculaire et peuvent également être retrouvées dans le plasma séminal des fumeurs. Gandini [148] montre dans une étude sur 10 patients le passage de la cotinine dans le liquide séminal, et une diminution de la mobilité des spermatozoïdes chez les fumeurs mais pas chez les fumeurs passifs. Ce passage est confirmé en 1993 par Pacifici [149] et Vine [150]. Zenzes [44] a montré que le cadmium (métal lourd), la nicotine, et les métabolites de la cotinine sont détectables dans les tissus germinaux proportionnellement à la consommation tabagique du patient. Le benzopyrène, hydrocarbure polycyclique aromatique carcinogène retrouvé dans la fumée de cigarette se fixe à l'ADN des spermatozoïdes et l'altère.

Wong [71] a mesuré la concentration en cotinine dans le sang et le plasma séminal chez 107 hommes fertiles vs 103 n'ayant pas obtenu de grossesse dans leur couple. Les résultats ont montré une corrélation entre le nombre de cigarettes fumées quotidiennement et la concentration de cotinine dans le sang et le plasma séminal dans les groupes fumeurs ou non fumeurs ceci quel que soit le statut de fertilité (380 vs 260 µg/l dans le sang, et 10 vs 10 µg/l dans le plasma séminal). Plus la consommation tabagique était importante plus les concentrations sanguine et séminale étaient élevées. Selon lui, la cotinine ne semble pas être le facteur influençant la fertilité mais un bon marqueur de l'intoxication tabagique. En effet, dans cette étude l'influence mineur de la cotinine sur les paramètres spermatiques des fumeurs laisse penser que les effets de la cigarette sur la spermatogenèse des fumeurs seraient plutôt dus à d'autres substances retrouvées dans la fumée de cigarette (hydrocarbures, aldéhydes, acétone...).

Perspectives de Recherches : Tabac et Infertilité

Forts de ces différents résultats et de l'analyse de la littérature, nous avons mis en place les études suivantes dont les résultats nous permettront de mieux appréhender ces problématiques

Etude Rétrospective sur 1 200 tentatives d'AMP

Afin d'augmenter la puissance statistique de notre analyse, nous avons déjà recueilli les données d'une plus large étude rétrospective qui concernera 1 200 couples pris en charge en AMP.

Nous nous intéresserons aux paramètres de l'AMP en fonction des statuts tabagiques de chaque membre du couple.

Nous prendrons également en considération dans cette étude le niveau d'exposition aux pesticides rattaché au lieu d'habitation des couples afin d'appréhender la notion de co-exposition et de déterminer si celle-ci pourrait avoir un impact délétère sur la fertilité des couples.

Dosages sanguins de nicotine et de cotinine dans le cadre du PHRC

(En collaboration avec le service de Pharmacologie du CHU d'Amiens)

Nous réaliserons ces dosages sanguins chez les 163 couples inclus dans le PHRC (90 couples infertiles et 73 couples fertiles).

Par la réalisation de ces dosages et leur analyse, nous chercherons à répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une différence de dosages des dérivés du tabac dans le sang entre une population de couples infertiles et une population de couples fertiles ?*
- Les résultats de ces dosages sont-ils corrélés aux résultats obtenus dans les liquides folliculaires ?*
- N'y a-t-il pas un effet d'accumulation des dérivés du tabac dans les liquides folliculaires, accumulation qui pourrait s'avérer délétère sur le développement folliculaire ?*
- Existe-t-il une corrélation entre les dosages des dérivés du tabac dans le sang et les différents paramètres de l'AMP ?*

Perspectives de Recherches : Tabac et Infertilité

Dosages séminaux de nicotine et de cotinine dans le cadre du PHRC

(En collaboration avec le service de Pharmacologie du CHU d'Amiens)

Nous réaliserons ces dosages dans les liquides séminaux sanguins chez les 90 couples infertiles inclus dans le PHRC.

Par la réalisation de ces dosages et leur analyse, nous chercherons à répondre aux questions suivantes :

-Existe-t-il une corrélation entre les dosages des dérivés du tabac dans les liquides séminaux et le statut tabagique des hommes infertiles ?

-Existe-t-il une corrélation entre les dosages des dérivés du tabac dans les liquides séminaux et les paramètres du sperme (dont la fragmentation de l'ADN spermatique et l'index de dénaturation de celui-ci)

Projet Innovations : « Aller au-delà dans l'analyse du spermogramme »

Obtention d'un financement de 60 000 euros dans le cadre d'un « Appel à Projets Innovations » organisé par la Direction de la Recherche Clinique du CHU d'Amiens

Nous allons mettre en place une paillasse spécifique « Recherche » au sein de notre service permettant la réalisation des analyses spermatiques complémentaire suivantes : Fragmentation de l'ADN spermatique, index de dénaturation de l'ADN spermatique, recherche d'ADN libre circulant dans le sang et dosage de la PCL-zeta.

La recherche d'ADN libre circulant dans le sang pourra également être mise en place chez la femme prise en charge en AMP.

Ces techniques d'évaluation complémentaires nous permettront de mieux appréhender l'impact du stress oxydant, en particulier en cas de tabagisme, sur la fertilité des couples.

II. THEMATIQUE IMPACT DES PESTICIDES SUR LA FERTILITE

Dans l'analyse du PHRC, il n'y a pas été retrouvé d'effet de l'exposition professionnelle ou domestique aux produits phyto-sanitaires sur le statut fertile ou infertile des couples. Cependant, la notion d'exposition est à prendre avec précaution car il est possible, que même se disant non exposés par ses activités professionnelles ou domestiques, les couples soient différemment exposés par leur lieu de vie.

C'est en prenant en considération ce paramètre que nous nous sommes intéressés à l'analyse des paramètres des tentatives d'AMP, et plus spécifiquement, celui de la dysmorphie ovocytaire à type de granulations cytoplasmiques, en fonction de l'origine du lieu d'habitation des couples et de leur niveau d'exposition aux pesticides. Cette analyse nous a permis d'établir un lien entre l'observation de plus de 75% d'ovocytes granuleux et le lieu de vie dans une zone d'exposition élevée des couples. L'observation d'un nombre important d'ovocytes granuleux était également rattachée à de moindres taux de fécondation, taux de grossesses évolutives et d'accouchement et à un risque de fausses couches du premier trimestre de la grossesse multiplié par trois [151].

Les résultats des différentes études ne convergent pas clairement vers une conclusion commune probablement du fait de nombreux facteurs de confusion non pris en compte dans les études. La détection des pesticides dans le liquide folliculaire semble avoir un impact négatif sur le développement embryonnaire [152].

Perspectives de Recherches : Pesticides et Infertilité

Dosages urinaires des principaux pesticides (20) dans le cadre du PHRC

(En collaboration avec le service de Toxicologie du CHU de Limoges)

Nous réaliserons ces dosages urinaires chez les 163 couples inclus dans le PHRC (90 couples infertiles et 73 couples fertiles).

Par la réalisation de ces dosages et leur analyse, nous chercherons à répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une différence des dosages des 20 pesticides les plus fréquents dans les urines entre une population de couples infertiles et une population de couples fertiles ?*
- Existe-t-il une corrélation entre les dosages des 20 pesticides les plus fréquents dans les urines et les différents paramètres de l'AMP ?*

CONCLUSION

L'impact des facteurs environnementaux sur la fertilité est une problématique émergente de santé publique. Les rôles respectifs du tabac et des pesticides sont complexes à étudier, notamment à cause de la diversité des mécanismes d'action en jeu.

Les études épidémiologiques sont nombreuses à avoir rapporté une relation entre l'exposition à un type précis de perturbateur endocrinien et des troubles de la fertilité mais leur caractère généralement transversal, le nombre élevé et imprécis des facteurs confondants et les difficultés méthodologiques inhérentes aux travaux d'épidémiologie environnementale rendent leur niveau de preuve insuffisant pour en tirer des conclusions générales.

Nos résultats sont en faveur d'un tabagisme significativement plus important chez les couples infertiles en comparaison à une population de couples fertiles. Nos travaux ont démontré le rôle important du tabagisme passif dans la survenue de l'infertilité. Les dosages de nicotine et de cotinine dans les liquides folliculaires de patientes non fumeuses sont les témoins de cette exposition passive.

Nous avons également pu mettre en évidence un lien entre dysmorphie ovocytaire et niveau d'exposition aux pesticides, à l'origine également d'une multiplication par trois des risques de pertes fœtales au premier trimestre de la grossesse.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique sur la thématique « Reproduction et Environnement » mis en place au sein de notre service. La recherche prévue des principaux pesticides utilisés dans la région dans les urines des couples infertiles nous permettra, en comparaison aux résultats qui seront obtenus chez les couples fertiles, de mieux caractériser le niveau d'exposition et le lien entre celui-ci et infertilité.

Devant les résultats dont nous disposons ainsi que l'analyse de la littérature que nous avons pu établir, il paraît important de sensibiliser les couples aux conséquences des perturbateurs endocriniens, tabac et pesticides en particulier, sur leur fertilité.

BIBLIOGRAPHIE

1. Colborn T. Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy : endocrinological effects on wildlife. *Environ. Health Perspect.* 1995 ; 103 : 81–85.
2. European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife : 2-4 December 1996, Weybridge, UK. Report of Proceedings ; European commission.
3. « WHO | Effects of human exposure to hormone-disrupting chemicals examined in landmark UN report », *WHO*. [En ligne]. Disponible sur : http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/en/. [Consulté le : 16-juill-2018].
4. Desmots S, Brulez C, Lemazurier E. Endocrine disrupters and human health : A non-exhaustive review. *Environ. Risques Santé.* 2005 ; 4 : 195-204.
5. Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl.* 2008 ; 10 : 134–145.
6. Du Y. Urinary phthalate metabolites in relation to serum anti-Müllerian hormone and inhibin B levels among women from a fertility center : a retrospective analysis. *Reprod. Health.* 2018 ; 15 : 33.
7. Trabert B, Longnecker MP, Brock JW, Klebanoff MA, McGlynn KA. Maternal Pregnancy Levels of trans-Nonachlor and Oxychlorane and Prevalence of Cryptorchidism and Hypospadias in Boys. *Environ. Health Perspect.* 2012 ; 120 : 478-482.
8. Nassar N, Abeywardana P, Barker A, Bower C. Parental occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals and risk of hypospadias in infants. *Occup Environ Med.* 2010 ; 67 : 585-589.
9. Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gérard A, Bourguignon JP. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Fron. Neuroendocrinol.* 2015 ; 38 : 12-36.
10. Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, De Vendômois JS. Republished study : long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environ Sci Eur.* 2014 ; 26 (1) : 14.
11. Carson R, *Silent Spring*. Houghton Mifflin Harcourt, 2002.
12. Guillette LJ, Gross TS, Masson GS, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 1994. 102 (8) : 680.
13. Mocarelli P. Dioxin Exposure, from Infancy through Puberty, Produces Endocrine Disruption and Affects Human Semen Quality. *Environ. Health Perspect.* 2008 ; 116(1) : 70-77.
14. Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, A Flows J. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J Endocrinol* 2017; 233: R109-R129.
15. Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicology letters* 2013; 223: 295-305.

16. Thoma ME. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil. Steril.* 2013 ; 99(5) :1324-1331.
17. Quesada-Calderón S, Bacigalupe LD, Toro-Vélez AF, Madera-Parra CA, Peña-Varón MR, Cárdenas-Henao H. The multigenerational effects of water contamination and endocrine disrupting chemicals on the fitness of *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol.* 2017 ; 7(16) : 6519-6526.
18. Cha S, Baek JW, Ji HJ, Choi JH, Kim C, Lee MY, Hwang YJ, Yang E, Lee SH, Jung HI, Cheon YP. Disturbing Effects of Chronic Low-dose 4-Nonylphenol exposing on Gonadal Weight and Reproductive Outcome over One-generation. *Dev Reprod.* 2017; 21 (2):121-130.
19. Brieno-Enriquez MA, Garcia-Lopez J, Cardenas DB, Guibert S, Cleroux E, Ded L, de Dios Hourcade J, Peknicova J, Weber M, del Mazo J. Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of micro RNAs in primordial germ cells. *Plos One.* 2015: 21.
20. Naughton CK. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility », *Yearb. Urol.* 2006 : 224-225.
21. Strazzullo M, Matarazzo MR. Epigenetic Effects of Environmental Chemicals on Reproductive Biology. *Curr. Drug Targets.* 2017 ; 18(10) :1116-1124.
22. Wei Y, Schatten H, Sun KY. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 2015 ; 21 (2) : 194-208.
23. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005 ; 308 : 1466-1469.
24. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for Decreasing Quality of Semen During Past 50 Years. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1993 ; 48 (3) : 200-201.
25. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract ? *The Lancet* 1993. 341 :1392-1396.
26. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. *N. Engl. J. Med.* 1995 ;332 (5) : 281-285.
27. Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum. Reprod.* 2013 ; 28(2) : 462-470.
28. Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil. Steril.* 2011 ; 95 (2) : 625-630.
29. Messerlian C, Souter I, Gaskins AJ, Williams PL, Ford JB, Chiu YH. Urinary phthalate metabolites and ovarian reserve among women seeking infertility care. *Hum Reprod.* 2016; 31: 75-83.
30. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori Z. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 2005 ; 20 (8) : 2325-2329.
31. « Baromètre santé – Conduites addictives en Picardie (Les 15-34 ans en 2010) ». [En ligne]. Disponible sur : <http://www.or2s.fr/index.php/thematiques/tabac/190-barosante-picardie-addiction>. [Consulté le : 24-juill-2018].
32. Bolumar F, Olsen J, Boldsen J. Smoking reduces fecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity. The European Study Group on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol.* 1996; 143:578-587.

33. Curtis KM, Savitz DA, Arbuckle TE. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *Am J Epidemiol.* 1997; 146:32-41.
34. Berthiller J, Sasco AJ. [Smoking (active or passive) in relation to fertility, medically assisted procreation and pregnancy]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2005; 34 (1): S47-54.
35. Dorfman SF. Tobacco and fertility: our responsibilities. *Fertil Steril* 2008; 89:502-504.
36. Cooper AR, Moley KH. Maternal tobacco use and its preimplantation effects on fertility: more reasons to stop smoking. *Semin Reprod Med.* 2008; 26:204-212.
37. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 1998; 13:1532-1539.
38. Jensen TK, Henriksen TB, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, Ernst E, et al. Adult and prenatal exposures to tobacco smoke as risk indicators of fertility among 430 Danish couples. *Am J Epidemiol.* 1998; 148:992-997.
39. Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet.* 2001; 28:355-360.
40. Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod.* 2006; 21:610-617.
41. Neal MS, Zhu J, Holloway AC, Foster WG. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay. *Hum Reprod.* 2007; 22:961-967.
42. Sharara FI, Beatse SN, Leonardi MR, Navot D, Scott RT, Jr. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril.* 1994; 62:257-262.
43. Paksy K, Rajczy K, Forgacs Z, Lazar P, Bernard A, Gati I, Kaali GS. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J Appl Toxicol.* 1997; 17:321-327.
44. Zenzes MT, Puy LA, Bielecki R. Immunodetection of cotinine protein in granulosa-lutein cells of women exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril.* 1997; 68:76-82.
45. Gocze PM, Szabo I, Freeman DA. Influence of nicotine, cotinine, anabasine and cigarette smoke extract on human granulosa cell progesterone and estradiol synthesis. *Gynecol Endocrinol.* 1999; 13:266-272.
46. El-Nemr A, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower AM, Grudzinskas JG. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1998; 13:2192-2198.
47. Neal MS, Zhu J, Foster WG. Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reprod Toxicol.* 2008; 25 (1): 100-106.
48. Freour T, Masson D, Mirallie S, Jean M, Bach K, Dejoie T, Barriere P. Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16:96-102.
49. Di Prospero F, Luzi S, Iacopini Z. Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reprod Biomed Online.* 2004; 8(2): 246-7.

50. Zenzes MT, Reed TE, Casper RF. Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod.* 1997; 12:1736-1741.
51. Hughes EG, YoungLai EV, Ward SM. Cigarette smoking and outcomes of in-vitro fertilization and embryo transfer: a prospective cohort study. *Hum Reprod.*1992; 7: 358-361.
52. Shiloh H, Lahav-Baratz S, Koifman M, Ishai D, Bidder D, Weiner-Meganzi Z, Dirnfeld M. The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum Reprod.*2004; 19: 157-159.
53. Crha I, Hrubá D, Fiala J, Ventruba P, Zaková J, Petrenko M. The outcome of infertility treatment by in-vitro fertilisation in smoking and non-smoking women. *Cent Eur J Public Health.* 2001; 9: 64-68.
54. Weigert M, Hofstetter G, Kaipl D, Gottlich H, Krischker U, Bichler K, Pöhl M, et al. The effect of smoking on oocyte quality and hormonal parameters of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16:287-293.
55. Zitzmann M, Rolf C, Nordhoff V, Schrader G, Rickert-Fohring M, Gassner P, Behre HM, et al. Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003;79 (3):1550-1554.
56. Depa-Martynow M, Jedrzejczak P, Tazarek-Hauke G, Josiak M, Pawelczyk L. The impact of cigarette smoking on oocytes and embryos quality during in vitro fertilization program. *Przegl Lek.* 2006; 63: 838-840.
57. Zenzes MT, Puy LA, Bielecki R. Immunodetection of cotinine protein in granulosa-lutein cells of women exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril.* 1997; 68 (1): 76-82.
58. Pattinson HA, Taylor PJ, Pattinson MH. The effect of cigarette smoking on ovarian function and early pregnancy outcome of in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril.* 1991; 55:780-783.
59. Soares SR, Melo MA. Cigarette smoking and reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20:281-291.
60. Knoll M, Shaoulian R, Magers T, Talbot P. Ciliary Beat Frequency of Hamster Oviducts is Decreased in Vitro by Exposure to Solutions of Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke. *Biol Reprod.* 1995 ; 53(1) :29-37.
61. Venners SA, Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, Huang A, et al. Paternal smoking and pregnancy loss: a prospective study using a biomarker of pregnancy. *Am J Epidemiol.* 2004; 159:993-1001.
62. Triopon G, Tailland ML, Faillie JL, Bolzinger E, Mercier G, Ripart S, Boyer JC, Fabbro-Peray P, Poirey S, Archambault A, Marès P. Fécondation in vitro et tabac : intérêt de la cotininurie et de l'analyseur de monoxyde de carbone expiré. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2006 ; 34.
63. Zavos PM, Correa JR, Antypas S, Zarmakoupis-Zavos PN, Zarmakoupis CN. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. *Fertil Steril.* 1998; 69: 425-429.
64. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and non smokers in infertile couples. *Fertil Steril.* 2003; 79: 287-291.
65. Rubes J, Lowe X, Moore D, 2nd, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril.* 1998; 70: 715-723.

66. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*. 2006; 223: 54-60.
67. Santos EP, Lopez-Costa S, Chenlo P, Pugliese MN, Curi S, Ariagno J. Impact of spontaneous smoking cessation on sperm quality: case report. *Andrologia*. 2011; 43(6): 431-5.
68. Hoidas S, Williams AE, Tocher JL, Hargreave TB. Scoring sperm morphology from fertile and infertile cigarette smokers using the scanning electron microscope and image analysis. *Fertil Steril*. 1985; 43 (4): 595-8.
69. Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, Zarmakoupis-Zavos PN. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril*. 1998; 69: 430-434.
70. Mak V, Jarvi K, Buckspan M, Freeman M, Hechter S, Zini A. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urology*. 2000; 56: 463-466.
71. Wong WY, Thomas CM, Merkus HM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril*. 2000; 74:930-935.
72. Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, Akyolcu MC. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res*. 2007; 120:82-91.
73. Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000; 6:122-131.
74. Faure AK, Akin-Seifer I, Frerot G, Pelletier R, De Robertis C, Cans C, Levy R, et al. Predictive factors for an increased risk of sperm aneuploidies in oligo-astheno-teratozoospermic males. *Int J Androl*. 2007; 30:153-162.
75. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol*. 1995; 154:1030-1034.
76. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res*. 1999; 423:103-111.
77. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*. 2002; 78: 491-499.
78. Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod*. 2000; 15:1314-1321.
79. Vilorio T, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril*. 2007; 88:523-525.
80. Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1999; 93:25-29.
81. Vilorio T, Rubio MC, Rodrigo L, Calderon G, Mercader A, Mateu E, Meseguer M, et al. Smoking habits of parents and male: female ratio in spermatozoa and preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2005; 20:2517-2522.

82. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:238-244.
83. Jensen MS, Mabeck LM, Toft G, Thulstrup AM, Bonde JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod* 2005; 20:2559-2566.
84. Jensen TK, Henriksen TB, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, Ernst E, Bonde JP, Skakkebaek NE, Olsen J. Adult and prenatal exposures to tobacco smoke as risk indicators of fertility among 430 Danish couples. *Am J Epidemiol.* 1998 ;148(10) : 992-7.
85. Thorup J, Cortes D, Petersen BL. The incidence of bilateral cryptorchidism is increased and the fertility potential is reduced in sons born to mothers who have smoked during pregnancy. *J Urol.* 2006; 176:734-737.
86. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Olsen J, Ernst E, Andersen CY, Bonde JP. Maternal smoking in pregnancy and reproductive hormones in adult sons. *Int J Androl.* 2008; 31(6):565-72.
87. Meeker JD, Missmer SA, Cramer DW, Hauser R. Maternal exposure to second-hand tobacco smoke and pregnancy outcome among couples undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2007; 22:337-345.
88. Sondergaard C, Henriksen TB, Obel C, Wisborg K. Smoking during pregnancy and infantile colic. *Pediatrics* 2001; 108:342-346.
89. Hughes EG, Yeo J, Claman P, YoungLai EV, Sagle MA, Daya S, Collins JA. Cigarette smoking and the outcomes of in vitro fertilization: measurement of effect size and levels of action. *Fertil Steril.*1994; 62:807-814.
90. Neal MS, Hughes EG, Holloway AC, Foster WG. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2005; 20:2531-2535.
91. Hyland A, Piazza K, Hovey KM, Tindle HA, Manson JE, Messina C, Rivard C, Smith D, Wactawski-Wende J. Associations between lifetime tobacco exposure with infertility and age at natural menopause: The Women's Health Initiative Observational Study. *Tob Control.* 2016 ;25(6):706-714.
92. « La qualité de l'eau et assainissement en France (annexes) ». [En ligne]. Disponible sur : <https://www.senat.fr/rap/102-215-2/102-215-239.html>. [Consulté le : 24-juill-2018].
93. Inserm, « Pesticides : Effets sur la santé », *Inserm*, 2013. [En ligne]. Disponible sur : http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/4820/Chapitre_1.html. [Consulté le : 12-juill-2018].
94. Lin N, Garry VF. In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2000; 60: 423–439.
95. Rocheleau CM, Romitti PA, Dennis LK. Pesticides and hypospadias: a meta-analysis. *J. Pediatr. Urol.* 2009; 5:17–24.
96. Short P, Colborn T. Pesticide use in the U.S. and policy implications: a focus on herbicides. *Toxicol. Ind. Health.* 1999;15: 240–275.
97. Carmichael SL, Yang W, Roberts EM, Kegley SE, Wolff C, Guo L, Lammer EJ, English P, Shaw GM. Hypospadias and Residential Proximity to Pesticide Applications. *Pediatrics.* 2013; 132:1226.

98. « Health Outcomes | Agricultural Health Study ». [En ligne]. Disponible sur : <https://aghealth.nih.gov/collaboration/outcomes.html>. [Consulté le : 24-juill-2018].
99. Nagel SC, Vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect.* 1997 ; 105(1): 70-6.
100. Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier MC, Lesaffre C, Fulla Y, Berges R, Cravedi JP, Vaiman D, Auger J. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect.* 2009 ; 117(8) : 1272-9.
101. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect.* 2003 ; 111(8) : 994-1006.
102. Bishop CA, Brooks RJ, Carey JH, Norstrom PNRJ, Lean DRS. The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in egg of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) from Ontario, Canada. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1991 ; 33 : 521-547.
103. Guillette LJ, Brock JW, Rooney AA, Woodward AR. Serum concentration of various environmental contaminants and their relationship to sex steroid concentration and phallus size in juvenile American alligators. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1999 ; 36 : 447-455.
104. Munkittrick KR, Port CB, Van Der Kraak GJ, Smith IR, Rokosh DA. Impact of bleach kraft mill effluent on population characteristics ; liver MFO activity ; and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1991 ; 48 : 1371-1380.
105. Fry DM, Toone CK, Speich SM, Peard RJ. Sex ratio skew and breeding patterns of gulls, demographic and toxicological considerations. *Stud. Avian Biol.* 1987 ; 10 : 26-43.
106. Facemire CF, Gross TS, Guillette LJ. Reproductive impairment in the Florida panther : Nature or nurture? *Environ. Health Perspect.* 1995 ; 103 : 79-86.
107. Oskam LC, Ropstad E, Dahl E, Lie E, Derocher AE, Wiig O, Larsen S, Wiger R, Skaare JU. Organochlorines affect the major androgenic hormone ; testosterone ; in male polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2003 ; 66 : 2119-2139.
108. Mnif W, Pillon A, Balaguer P, Bartegi A. Endocrine xenoestrogens disrupters, molecular mechanisms and detection methods. *Thérapie* 2007 ; 62 : 369-386.
109. Joshi SC, Mathur R, Gulati N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicol Ind Health.* 2007 ; 23(7) : 439-44.
110. Akhtar N, Srivastava MK, Raizada RB. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus*. *J Environ Biol.* 2009 ; 30(6) : 1047-53.
111. Farag AT, Radwan AH, Sorour F, El Okazy A, El-Agamy el-S, El-Sebae Ael-K. ; Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. *Reprod Toxicol.* 2010 ; 29(1) : 80-5.
112. Manikam Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod Toxicol.* 2012 ; 34(4) : 708-19.
113. Alavanja MC, Sandler DP, McMaster SB, Zahm SH, McDonnell CJ, Lynch CF, et al. The Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect.* 1996 ; 104(4) : 362-9.

114. Bretveld RW, Hooiveld M, Zielhuis GA, Pellegrino A, van Rooij IALM, Roeleveld N. Reproductive disorders among male and female greenhouse workers. *Reprod Toxicol*. 2008 ;25(1) :107-14.
115. De Cock J, Westveer K, Heederik D, te Velde E, van Kooij R. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in The Netherlands. *Occup Environ Med*. 1994 ;51(10) :693-9.
116. Sallmen M, Liesivuori J, Taskinen H, Lindbohm M-L, Anttila A, Aalto L, et al. Time to pregnancy among the wives of Finnish greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health*. 2003 ;29(2) :85-93.
117. Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect*. 1998 ;106(12) :793-6.
118. Nassar N, Abeywardana P, Barker A, Bower C. Parental occupational exposure to potential endocrine disrupting chemicals and risk of hypospadias in infants. *Occup Environ Med*. 2010 ;67(9) :585-9.
119. Curtis KM, Savitz DA, Weinberg CR, Arbuckle TE. The Effect of Pesticide Exposure on Time to Pregnancy : *Epidemiology*. 1999 ;10(2) :112-7.
120. Harley KG, Marks AR, Bradman A, Barr DB, Eskenazi B. DDT Exposure, Work in Agriculture, and Time to Pregnancy Among Farmworkers in California : *J Occup Environ Med*. 2008 ;50(12) :1335-42.
121. Idrovo AJ, Sanin LH, Cole D, Chavarro J, Cáceres H, Narváez J, et al. Time to first pregnancy among women working in agricultural production. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005 ;78(6) :493-500.
122. Abell A, Juul S, Bonde JPE. Time to pregnancy among female greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health*. 2000 ;26(2) :131-6.
123. Grindler NM, Allsworth JE, Macones GA, Kannan K, Roehl KA, Cooper AR. Persistent Organic Pollutants and Early Menopause in U.S. Women. Rosenfeld CS, éditeur. *PLOS ONE*. 28 janv 2015; 10(1) : e0116057.
124. Chevrier C, Warembourg C, Gaudreau E, Monfort C, Le Blanc A, Guldner L, et al. Organochlorine Pesticides, Polychlorinated Biphenyls, Seafood Consumption, and Time-to-Pregnancy : *Epidemiology*. 2013 ;24(2) :251-60.
125. Whorton D, Krauss R, Marshall S, Milby T. INFERTILITY IN MALE PESTICIDE WORKERS. *The Lancet*. 1977 ;310(8051) :1259-61.
126. Whorton D, Milby TH, Krauss RM, Stubbs HA. Testicular function in DBCP exposed pesticide workers. *J Occup Med Off Publ Ind Med Assoc*. 1979 ;21(3) :161-6.
127. Easley CA, Bradner JM, Moser A, Rickman CA, Mc Eachin ZT, Merritt MM. Assessing reproductive toxicity of two environmental toxicants with a novel in vitro human spermatogenic model. *Stem Cell Res*. 2015 ;14(3) :347-55.
128. Wyrobek AJ, Watchmaker G, Gordon L, Wong K, Moore D, Whorton D. Sperm shape abnormalities in carbaryl-exposed employees. *Environ Health Perspect*. 1981 ;40 :255-65.
129. Lerda D, Rizzi R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat Res Lett*. 1991 ;262(1) :47-50.
130. Lifeng T, Shoulin W, Junmin J, Xuezhao S, Yannan L, Qianli W, et al. Effects of fenvalerate exposure on semen quality among occupational workers. *Contraception*. 2006 ;73(1) :92-6.
131. Padungtod C, Savitz DA, Overstreet JW, Christiani DC, Ryan LM, Xu X. Occupational Pesticide Exposure and Semen Quality Among Chinese Workers : *J Occup Environ Med*. 2000 ;42(10) :982-92.

132. Padungtod C, Hassold TJ, Millie E, Ryan LM, Savitz DA, Christiani DC, et al. Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers : scoring by the FISH method. *Am J Ind Med.* 1999; 36(2):230-8.
133. Xia Y, Cheng S, Bian Q, Xu L, Collins MD, Chang HC, et al. Genotoxic Effects on Spermatozoa of Carbaryl-Exposed Workers. *Toxicol Sci.* 2005 ;85(1) :615-23.
134. Recio-Vega R, Ocampo-Gómez G, Borja-Aburto VH, Moran-Martínez J, Cebrian-Garcia ME. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality : association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *J Appl Toxicol.* 2008 ;28(5) :674-80.
135. Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF, et al. Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med.* 2004 ;61(12) :999-1005.
136. Sharara FI, Beatse SN, Leonardi MR, Navot D, Scott RT, Jr. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1994; 62:257-262.
137. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment : proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011 ;26(6) :1270-83.
138. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome : towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000 ;73(6) :1155-8.
139. Schlosser J, Nakib I, Carre-Pigeon F, Staerman F. Infertilité masculine : bilan *Annales d'urologie Editions : Elsevier, Décembre 2006, Vol. 40, Issue 6, p. 349-354.*
140. Ebner T, Shebl O, Oppelt P. Some Reflections on Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection *International journal of fertility & sterility, Juillet-septembre 2014, volume 8 (2), p. 105 - 112.*
141. Traver S, Scalici E, Mullet T et al. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes. *PLoS ONE* 10(8): e0136172. doi:10.1371/journal.pone.0136172, 19 Aout 2015.
142. Li HG, Huang SY, Zhou H et al. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities, *Asian Journal of Andrology*, Novembre 2009, Vol. 11, n°6, p. 703-709.
143. Auger J, Mesbah M, Huber C et al. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men, *International Journal of Andrology.* 1990 ;13 (6) : 452 - 462.
144. Weiss T, Eckert A. Cotinine levels in follicular fluid and serum of IVF patients: effect on granulosa-luteal cell function in vitro. *Human Reprod.* 1989;4(5):482-5.
145. Zenzes MT, Reed TE, Wang P, Klein J. Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in in vitro fertilization therapy. *Fertil Steril* 1996;66(4):614-9.
146. Paszkowski T. Concentration gradient of cotinine between blood serum and preovulatory follicular fluid. *Ginekol Pol* 1998;69(12):1131-6.
147. Fuentes A, Munoz A, Barnhart K, Argüello B, Diaz M, Pommer R. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. *Fertility and Sterility* 2010. 93(1):89-95.

148. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Culasso F, Pacifici R, Zuccaro P, Dondero F. The in-vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. *Hum Reprod* 1997; 12:727-733.
149. Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, et al. Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit* 1993; 15:358-363.
150. Vine MF, Hulka BS, Margolin BH, Truong YK, Hu PC, Schramm MM, Griffith JD. Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers. *Am J Public Health* 1993; 83:1335-1338.
151. Merviel P, Cabry R, Chardon K, Haraux E, Scheffler F, Mansouri NB, Devaux A, Chahine H, Bach V, Copin H, Benkhalifa M. Impact of oocytes with CLCG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure. *J Ovarian Res.* 2017;10(1):42.
152. Easley CA, Bradner JM, Moser A, Rickman CA, McEachin ZT, Merritt MM, et al. Assessing reproductive toxicity of two environmental toxicants with a novel in vitro human spermatogenic model. *Stem Cell Res.* 2015 ;14(3) :347-55.

LISTE DES ANNEXES (1)

Annexe 1 : Liste des 20 pesticides les plus utilisés en Picardie

Source : Laboratoire Pérیتox

Annexe 2 : Fiche d'informations dédiée aux couples du groupe « Infertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

Annexe 3 : Fiche d'informations dédiée aux couples du groupe « Fertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

Annexe 4 : Consentement éclairé dédié aux couples du groupe « Infertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

Annexe 5 : Consentement éclairé dédié aux couples du groupe « Fertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

Annexe 6 : Questionnaires d'exposition toxique dédié aux femmes du groupe « Fertile »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

Annexe 7 : Cinétique de développement embryonnaire selon la classification d'Istanbul

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

Annexe 8 : Classification embryonnaire au stade blastocyste selon Gardner

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

Annexe 9 : Fiche technique de réalisation des dosages de nicotine et de cotinine

Source : Service de Pharmacologie du CHU d'Amiens

Annexe 10 : Technique de fragmentation de l'ADN spermatique

Annexe 11 : Technique de détermination de l'indice de dénaturation de l'ADN spermatique

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

Annexe 1 : Liste des 20 pesticides les plus utilisés en Picardie

Source : Laboratoire Pérیتox

CARBAMATES

1. Mancozebe

FONGICIDES (poudre, granulés ou suspension)

Pomme de terre (mildiou)/vigne (mildiou) /tabac (mildiou)/ salade/tomate

Non inhibiteur des cholinestérases

Inhibiteurs de la thyroperoxydase (H thyroïdienne)

Inhibiteur parois cellulaires (inhibition de contact, inhibition des zoospore action anti sporulante).

R63/H361 : effets néfastes pendant la grossesse

2-3 Métabolites carbamates

ETU EU

½ vie ETU = 100h

PHENYLUREES

4. Isoproturon

HERBICIDES (solides mais solubles)

Blé, graminées annuelles, (blé, tendre d'hiver, orge, lavande, graminées fouragères, culture porte graine mineures...)

Inhibiteurs de la photosynthèse par blocage de la protéine d1 du photosystème II

H351 cancérigène cat 2

5-6 Métabolites

4-IA

MDIPU

AMMONIUMS QUATERNAIRES

7. Chlorure de chlorméquat

REGULATEURS DE CROISSANCE

Blé tendre d'hiver

Inhibiteurs ac gibberillique

ARYLOXYDES PHENOXY

8. 2.4MCPA

ORGANOPHOSPHORES

9. Chlorpyrifos

INSECTICIDES

Culture du coton, du maïs, des amandes et pour les arbres fruitiers (oranges et pommes en particulier). Céréales (parties aériennes, puceron), épinard (traitement du sol)
inhibiteur acétylcholinestérase

10. Diazinon

INSECTICIDES

Inhibiteur acétylcholinestérase

R22 (nocif ingestion) R50/53 (environnement orga aquatique)

11. Malathion

INSECTICIDES (suaterlles, pucerons,mites,mouches domestiques)

Légumes (asperges, tomates pomme de terre), grandes cultures (blé, avoine, seigle, céréales, lin, colza), animaux, batiments de ferme

Inhibiteur acétylcholinestérase

12-17-Métabolites des organophosphorés

DMP,DMTP,DMDTP,DEP,DETP, DEDTP

PYRETHRINOIDES

18 Cyperméthrine

INSECTICIDES

Contre les mouches domestiques, mouches à viande et autres diptères, moustiques, guêpes, frelons, Blattes, poux, puces, perce-oreilles, fourmis, coléoptères, larves de lépidoptères, aphides, insectes xylophages etc

Ouverture du canal sodium du SN

Perturbateur endocrinien suspecté (alpha cyperméthrine)

R37 Irritant pour les voies respiratoires

R50/53 (orga aquatiques)

R20/22 (nocif inhalation ingestion)

19 Deltaméthrine

INSECTICIDES

Céréales, vigne, arboriculture,légumes, pomme de terre

Ouverture canal sodium

R50/53 (orga aquatiques)

R23/25 (toxique inhalation ingestion)

20 Cyfluthrine

Annexe 2 : Fiche d'informations dédiée aux couples du groupe « Infertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONNATEUR
<p>Madame Catherine GEINDRE Directrice Générale du CHU d'Amiens Par délégation, Monsieur le Docteur Jean-Claude BARBARE Coordonnateur de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU d'Amiens – Site Nord 1 Place Victor PAUCHET 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-66-80-60 Fax : 03-22-66-87-52 Email : barbare.jeanclaudio@chu-amiens.fr</p>	<p>Madame le Docteur Aviva DEVAUX Laboratoire de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique CHU d'Amiens – Site CGO 123 rue Camille DESMOULINSt 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-53-36-75 Fax : 03-22-53-36-79 Email : devaux.aviva@chu-amiens.fr</p>

Madame, Monsieur,

Vous consultez pour infertilité, le recours à une Assistance Médicale à la Procréation (AMP) vous a été proposé. Parmi les facteurs pouvant intervenir sur la fertilité figure le tabac. Le rôle du tabac est encore mal connu. C'est pourquoi le Docteurvous propose de participer à une étude destinée à évaluer précisément ce rôle. Ce protocole, qui doit inclure 200 couples fertiles et 200 infertiles, a pour but d'améliorer la prise en charge en AMP des couples infertiles. Les résultats des tentatives d'AMP seront analysés en fonction du statut tabagique et comparés aux données recueillies chez 200 couples fertiles. Ses principales caractéristiques et contraintes sont résumées ci-après.

Les objectifs sont l'évaluation de la consommation de tabac et son impact sur la fertilité.

Le nom du PROTOCOLE : Impact du tabagisme masculin sur l'infertilité du couple : étude cas-témoins bicentrique (Tabafertimasc)

Il sera mené conformément au Code de santé publique titre II du premier livre relatif aux recherches biomédicales. Le Comité de Protection des personnes NORD OUEST II a autorisé sa mise en œuvre le

Ce travail sera réalisé en collaboration avec des médecins spécialistes de l'exploration de l'infertilité (notamment le Dr A. Devaux coordinateur de l'étude et les Professeurs P. Merviel, les Dr E. Lourdel, Dr R. Cabry et F. Bresseur du CHU d'Amiens ; et les Pr M. Herlicoviez et Dr I. Denis Galleraud du CHRU de Caen).

L'étude comprend :

- La passation d'un questionnaire sur les habitudes de vie et du tabagisme pour chacun de vous
- Un ou plusieurs prélèvements cités ci-dessous sont nécessaires et font déjà parti du bilan pré AMP ou peuvent être réalisés lors du suivi de l'AMP:

- une prise de sang pour évaluer le taux de cotinine (dérivé de la nicotine)
- une mesure du monoxyde de carbone expiré à l'aide d'un testeur pour déterminer le taux de ce composé dans l'air que vous expiré.
- un recueil de sperme effectué au laboratoire de Biologie de la Reproduction ou le jour de l'assistance médicale à la procréation pour analyser la spermatogenèse
- un recueil d'urine
- le recueil de quelques cheveux (4 à 6)
- le recueil des liquides folliculaires et milieux de cultures lors de la tentative d'AMP

L'ensemble des échantillons prélevés sera conservé en vue de la réalisation du protocole et pourront permettre d'éventuels recherches complémentaires à postériori. Ils feront l'objet d'une déclaration de « collection biologique » auprès du ministère de la santé et de la recherche. Vous devez obligatoirement être affilié à un régime de sécurité social ou être bénéficiaire d'un tel régime.

Les données nominatives de l'AMP informatisées seront traitées de façon habituelle dans le dossier médical conformément aux dispositions de la loi n° 2004-801 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements des données à caractère personnel et modifiant la loi 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. L'ensemble des données recueillies et analysées pour l'étude seront traitées de façon anonymisée. Vous êtes informés que vous pouvez à tout moment exercer votre droit d'accès et de rectification garanti par les articles 39 et 40 de ladite loi en vous adressant au coordinateur de l'étude au CHU d'Amiens (Téléphone : 0322533675 ou 77)

Votre adhésion à ce protocole ne conditionne en aucune façon votre prise en charge en AMP et ne modifiera en aucune manière le traitement de stimulation ovarienne ou la technique d'AMP choisie et adaptée à votre cas. Vous pouvez à tout moment refuser de participer à cette étude et à la conservation des prélèvements. Votre participation à l'étude étant limitée à votre tentative d'AMP et ne modifiant en aucune façon la prise en charge médicale il n'y aura pas de période d'exclusion si vous envisagez de participer ultérieurement à une autre étude.

Cette lettre d'information vous est remise lors d'une de vos consultations afin que vous puissiez la lire et en discuter éventuellement avec le médecin de votre choix et /ou avec vos proches. Par ailleurs toute connaissance médicale nouvelle susceptible de remettre en question votre participation au protocole vous sera communiquée. Vous avez également, avant pendant et après la réalisation de l'étude, la possibilité de poser toutes les questions que vous souhaitez en vous adressant au médecin qui vous aura pris en charge pour votre AMP.

Vous serez informé des résultats globaux de l'étude à la fin de celle-ci. Vous bénéficierez également de conseils personnalisés et recevrez des documents sur les recommandations à propos du tabac pour vous et votre conjoint. Le centre d'AMP du CHU participe à l'opération maternité sans tabac. Vous pouvez consulter les référents de ce programme à la maternité du CGO

Conformément à la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, et du décret d'application N° 91-440 du 14 mai 1991, le CHU d'Amiens, promoteur de l'étude, a souscrit une assurance couvrant les risques directs liés à l'étude dans la stricte application du protocole.

Nom de la compagnie :

Adresse :

Numéro de contrat :

Votre dossier médical reste strictement confidentiel. Il pourra être consulté par l'investigateur et son équipe médicale, les personnes mandatées par le promoteur et soumises au secret professionnel, et des personnes mandatées par les autorités sanitaires et judiciaires.

Remis le

A

Signature de l'investigateur

Annexe 3 : Fiche d'informations dédiée aux couples du groupe « Fertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONNATEUR
<p>Madame Catherine GEINDRE Directrice Générale du CHU d'Amiens Par délégation, Monsieur le Docteur Jean-Claude BARBARE Coordonnateur de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU d'Amiens – Site Nord 1 Place Victor PAUCHET 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-66-80-60 Fax : 03-22-66-87-52 Email : barbare.jeanclaud@chu-amiens.fr</p>	<p>Madame le Docteur Aviva DEVAUX Laboratoire de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique CHU d'Amiens – Site CGO 123 rue Camille DESMOULINSt 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-53-36-75 Fax : 03-22-53-36-79 Email : devaux.aviva@chu-amiens.fr</p>

Madame, Monsieur,

Dans le domaine de la fertilité, de nombreux facteurs interviennent. Parmi eux, le rôle du tabac est encore mal connu, bien qu'il semble important.

Pour ces raisons, nous recherchons des couples ayant **conçu naturellement** dont la femme vient d'accoucher qui accepteraient de participer à un protocole visant à étudier la relation entre le tabagisme masculin et la fertilité du couple.

Le nom du PROTOCOLE est : Impact du tabagisme masculin sur l'infertilité du couple : étude cas-témoins bicentrique (Tabafertimasc) Ce protocole qui doit inclure 200 couples fertiles et 200 infertiles a pour but d'améliorer la prise en charge en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) des couples infertiles. Les résultats des tentatives d'AMP seront analysés en fonction du statut tabagique des couples et comparés aux données recueillies chez 200 couples fertiles.

Cette étude, autorisée par le Comité de protection des personnes Nord Ouest II le..., sera réalisé en collaboration avec des médecins spécialistes de l'exploration de l'infertilité (notamment le Dr Devaux coordianteur de l'étude et les Professeurs P. Merviel, les Dr E. Lourdel, Dr R. Cabry et F. Brasseur du CHU d'Amiens ; et les Pr M. Herlicoviez et Dr I. Denis Galleraud du CHRU de Caen).

Le protocole fait appel à des méthodes simples et non invasives. Outre la passation d'un questionnaire sur les habitudes de vie et de consommation de tabac, les examens qui seront réalisés sont des mesures anthropométriques (poids, taille) ainsi qu'une prise de sang pour évaluer le taux de dérivés toxique du tabac en particulier la cotinine (dérivé de la nicotine) la mesure du monoxyde de carbone dans l'air que vous expirés et d'un recueil de quelques cheveux. Un recueil d'urine pourra être également demandé si vous ne souhaitez pas la prise de sang. Pour les hommes qui l'accepteraient un prélèvement de sperme sera également envisagé. L'ensemble des échantillons prélevés seront conservés en vue de la réalisation du protocole et pourront permettre d'éventuels recherches complémentaires à postériori. Ils feront l'objet d'une déclaration de « collection biologique » auprès du ministère de la santé et de la recherche

Vous devez obligatoirement être affilié à un régime de sécurité social ou être bénéficiaire d'un tel régime. L'informatisation des données nominatives seront traitées de façon habituelle dans le dossier médical et conforme aux dispositions de la loi n° 2004-801 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements des données à caractère personnel et modifiant la loi 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Vous êtes informés que vous pouvez à tout moment exercer votre droit d'accès et de rectification garanti par les articles 39 et 40 de ladite loi en vous adressant au coordinateur de l'étude au CHU d'Amiens (Téléphone : 0322533675 ou 77)

L'ensemble des données recueillies et analysées pour l'étude sera traité de façon anonymisée. Vous êtes informés que vous pouvez à tout moment exercer votre droit d'accès et de

rectification garanti par les articles 39 et 40 de ladite loi en vous adressant au coordinateur de l'étude au CHU d'Amiens (Téléphone : 0322533675 ou 77)

Les examens seront réalisés par les membres de l'équipe d'AMP, soit au CGO/CHU d'Amiens soit au CHRU de Caen.

Bien que votre participation à cette étude ne comporte pas de risques particuliers, conformément à la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, et du décret d'application N° 91-440 du 14 mai 1991, le CHU d'Amiens, promoteur de l'étude, a souscrit une assurance couvrant les risques directs liés à l'étude dans la stricte application du protocole.

Nom de la compagnie :

Adresse :

Numéro de contrat :

La durée totale du rendez-vous est d'environ 1h00 que nous essayerons de réaliser, dans la mesure du possible, lors de votre passage à la maternité.

S'agissant d'un protocole de recherche, certains des résultats n'ont pas de signification clinique au niveau individuel. Toutefois, si des dosages sanguins sont anormaux, ils vous seront bien sûr communiqués par courrier. Vous bénéficierez également de conseils personnalisés et de documents sur les recommandations à propos de la consommation de tabac pour vous et votre famille.

Cette lettre d'information vous est remise lors d'une de vos consultations afin que vous puissiez la lire et en discuter éventuellement avec le médecin de votre choix et /ou avec vos proches. Vous avez également avant pendant et après la réalisation l'étude la possibilité de poser toutes les questions que vous souhaitez en vous adressant au médecin qui vous aura pris en charge

Merci de nous retourner le coupon-réponse sur lequel vous aurez précisé, si vous acceptez de participer, les horaires qui vous conviennent le mieux pour un contact téléphonique afin de fixer le rendez-vous. Si, avant de prendre votre décision, vous avez des questions particulières sur ce protocole, n'hésitez pas à joindre le Dr Devaux (Tél. : 03.22.53.36.75), coordinateur en charge de ce programme.

Vous êtes bien sûr totalement libre de refuser de collaborer à ce protocole et de refuser la réalisation et la conservation des prélèvements. Mais si vous avez un peu de temps à nous consacrer pour ce protocole, nous vous en serions très reconnaissants. Nous tenons à vous informer que, parmi les personnes ayant répondu favorablement à notre proposition, nous ne retiendrons qu'un sous-échantillon.

En restant à votre disposition pour toute information complémentaire, je vous prie de croire, «cher(e)s» volontaires, à l'expression de mes salutations distinguées.

Dr.Devaux

Coordinateur de l'Etude

Merci de nous retourner le plus rapidement possible, dans l'enveloppe pré-affranchie ci-jointe, le formulaire. *MERCI POUR VOTRE PARTICIPATION*

Annexe 4 : Consentement éclairé dédié aux couples du groupe « Infertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONNATEUR
<p>Madame Catherine GEINDRE Directrice Générale du CHU d'Amiens Par délégation, Monsieur le Docteur Jean-Claude BARBARE Coordonnateur de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU d'Amiens – Site Nord 1 Place Victor PAUCHET 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-66-80-60 Fax : 03-22-66-87-52 Email : barbare.jeanclaudio@chu-amiens.fr</p>	<p>Madame le Docteur Aviva DEVAUX Laboratoire de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique CHU d'Amiens – Site CGO 123 rue Camille DESMOULINSt 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-53-36-75 Fax : 03-22-53-36-79 Email : devaux.aviva@chu-amiens.fr</p>

Mme (Nom, Prénom) née le

M r (Nom, Prénom) né le

Adresse :

Le Docteur : nous a proposé de participer à une étude organisée par le CHU d'Amiens concernant le rôle du tabac sur la fertilité.

L'étude sera menée conformément au Code de santé publique titre II du premier livre relatif aux recherches biomédicales

Le Comité Consultatif de Protection des Personnes NORD OUEST II a émis un avis favorable à la mise en œuvre de ce protocole le.....

Dans la lettre d'information qui nous a été remise, il nous a été précisé que nous sommes libres d'accepter ou de refuser sans que cela ne conditionne notre prise en charge en AMP ou ne modifie le traitement prévu pour sa mise en œuvre.

Nous avons reçu et nous avons bien compris les informations suivantes :

- Ce travail sera réalisé en collaboration avec des médecins spécialistes de l'exploration de l'infertilité sur 2 CHU Amiens et Caen
- Certains prélèvements seront nécessaires et sont pour certains réalisés dans le cadre de la fécondation in vitro, il s'agit:

- de la passation d'un questionnaire sur les habitudes de vie et de consommation de tabagisme pour chacun de vous et qui est réalisé lors du bilan d'infertilité

- d'un ou plusieurs prélèvements cités ci-dessous sont :

- une prise de sang pour évaluer le taux de cotinine (dérivé de la nicotine) qui pourra être réalisée en même temps que le bilan biologique pré AMP ou lors du cycle d'AMP
- une mesure du monoxyde de carbone expiré à l'aide d'un testeur pour déterminer le taux de ce composé dans l'air que vous expirez. et qui évalue le tabagisme récent
- recueil de quelques cheveux (4 à 6) pour évaluer le tabagisme chronique

- Certains milieux biologiques recueillis lors du bilan d'infertilité ou lors du cycle d'assistance médicale à la procréation au lieu d'être éliminés seront conservés en vue de la réalisation du protocole ou en vue de recherches complémentaires à postériori

- un recueil de sperme effectué au laboratoire de Biologie de la Reproduction lors du bilan d'infertilité ou le jour de l'AMP, préalable à la réalisation de la FIV, d'un recueil d'urine
- le recueil du liquide folliculaire lors de la ponction ovarienne

L'ensemble des échantillons prélevés sera conservé en vue de la réalisation du protocole et pourra permettre d'éventuelles recherches complémentaires à posteriori. Ils feront l'objet d'une déclaration de « collection biologique » auprès du ministère de la santé et de la recherche.

Nous confirmons être affilié à un régime de sécurité social ou être bénéficiaire d'un tel régime et nous sommes informés que conformément à la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, et du décret d'application N° 91-440 du 14 mai 1991, le CHU d'Amiens, promoteur de l'étude, a souscrit une assurance couvrant les risques directs liés à l'étude dans la stricte application du protocole.

Nom de la compagnie :

Adresse :

Numéro de contrat :

NOUS ACCEPTONS DE PARTICIPER A CETTE RECHERCHE DANS LES CONDITIONS PRECISEES CI-DESSUS.

Notre consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Nous conservons tous nos droits garantis par la Loi. Si nous le désirons ou si l'un d'entre nous le désire, nous sommes libres à tout moment de suspendre notre participation. Nous informerons alors le Docteur

Conformément à la loi « informatique et liberté », n° 2004-801 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements des données à caractère personnel et modifiant la loi 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, nous acceptons que les données enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé en préservant strictement notre anonymat. Les données qui nous concernent resteront strictement confidentielles et nous n'autorisons leur consultation que par des personnes qui collaborent à cette recherche, aux personnes mandatées par le promoteur et soumis au secret professionnel, et éventuellement à un représentant des autorités de santé ou judiciaire. Notre droit d'accès et de rectification à ces informations pourra s'exercer à tout moment auprès du Docteur Devaux.

Nous sommes informés que nous pourrions demander à tout moment toutes les informations complémentaires au Docteur Devaux en appelant le 0322533675 ou le 0322533677

Fait à le.....

En double exemplaire, dont un remis au couple

Signature de l'investigateur :

Signature précédée de la mention « lu et approuvé » par les 2 membres du couple :

Annexe 5 : Consentement éclairé dédié aux couples du groupe « Fertiles »

Source : PHRC « Tabafertimasc »

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONNATEUR
<p>Madame Catherine GEINDRE Directrice Générale du CHU d'Amiens Par délégation, Monsieur le Docteur Jean-Claude BARBARE Coordonnateur de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU d'Amiens – Site Nord 1 Place Victor PAUCHET 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-66-80-60 Fax : 03-22-66-87-52 Email : barbare.jeanclaudio@chu-amiens.fr</p>	<p>Madame le Docteur Aviva DEVAUX Laboratoire de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique CHU d'Amiens – Site CGO 123 rue Camille DESMOULINSt 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-53-36-75 Fax : 03-22-53-36-79 Email : devaux.aviva@chu-amiens.fr</p>

Mme (Nom, Prénom)

née le

M r (Nom, Prénom)

né le :

Adresse :

Le Docteur nous a proposé de participer à une recherche organisée par le CHU d'Amiens concernant le rôle du tabac sur la fertilité dont le rôle sur la fertilité du couple est encore mal connu. Cette étude qui doit inclure 200 couples fertiles et 200 infertiles a pour but d'évaluer la consommation de tabac et son impact sur la fertilité. Les résultats des tentatives d'Assistance Médicale à la Procréation des couples infertiles seront analysés en fonction du statut tabagique et comparés aux données recueillies chez 200 couples fertiles venant de procréer.

Cette étude sera menée conformément au Code de santé publique titre II du premier livre relatif aux recherches biomédicales

Ce travail sera réalisé en collaboration avec des médecins spécialistes de l'exploration de l'infertilité (notamment le Dr A. Devaux coordinateur de l'étude et les Professeurs P. Merviel, les Dr E. Lourdel, Dr R. Cabry et F. Bresseur du CHU d'Amiens ; et les Pr M. Herlicoviez et Dr I. Denis Galleraud du CHRU de Caen).

Il nous a été précisé que nous sommes libres d'accepter ou de refuser de participer à ce protocole et à la conservation des prélèvements. Nous sommes informés qu'à tout moment nous sommes libres de refuser de participer à cette étude et à la conservation des prélèvements sans que cela ne conditionne le suivi post-natal ou l'équipe de la maternité où nous avons été suivi pour la grossesse.

Nous avons reçu et j'ai bien compris les informations suivantes :

Certains prélèvements sont nécessaires

- d'un prélèvement de sang ou d'urine nous sera proposé.
- d'une mesure du taux de monoxyde de carbone dans l'air que nous expirons
- Le recueil de quelques cheveux

Nous aurons à répondre à un questionnaire sur nos habitudes de vie et sur notre consommation de tabac. Et nous confirmons que nous sommes disposés d'une affiliation au régime de sécurité social ou d'être bénéficiaire d'un tel régime.

L'ensemble des échantillons prélevés sera conservé en vue de la réalisation du protocole et pourront permettre d'éventuels recherches complémentaires à postériori. Ils feront l'objet d'une déclaration de « collection biologique » auprès du ministère de la santé et de la recherche

NOUS ACCEPTONS DE PARTICIPER A CETTE RECHERCHE DANS LES CONDITIONS PRECISEES CI-DESSUS.

Notre consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Nous conservons tous nos droits garantis par la Loi. Si nous le désirons, nous serons libres à tout moment de suspendre notre participation. Nous en informerons alors le Docteur Devaux

Nous sommes informés que conformément à la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, et du décret d'application N° 91-440 du 14 mai 1991, le CHU d'Amiens, promoteur de l'étude, a souscrit une assurance couvrant les risques directs liés à l'étude dans la stricte application du protocole.

Nom de la compagnie :

Adresse :

Numéro de contrat :

Le Comité Consultatif de Protection des Personnes NORD OUEST II a émis un avis favorable à la mise en œuvre de ce protocole le.....

Conformément à la loi « informatique et liberté », Nous acceptons que les données enregistrées à l'occasion cette étude puisse faire l'objet d'un traitement informatisé en préservant strictement notre anonymat. Les données qui nous concernent resteront strictement confidentielles et nous n'autorisons leur consultation que par des personnes qui collaborent à cette recherche et, éventuellement, un représentant des autorités de santé et judiciaires. Notre droit d'accès et de rectification à ces informations pourra s'exercer à tout moment auprès du Docteur Devaux.

Nous pourrons demander à tout moment toutes les informations complémentaires au Docteur Devaux en appelant le 0322533675 ou le 0322533677

Fait à

.....le

Signature de l'investigateur :

En double exemplaire, dont un remis à l'intéressé

Signature précédée de la mention « lu et approuvé » par chaque membre du couple:

Annexe 6 : Exemple de questionnaire d'exposition toxique s'adressant aux femmes fertiles.

Source : PHRC « Tabafertimasc »

IDENTIFICATION DU COUPLE

Date de la visite d'inclusion (JJ/MM/AAAA) : |_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|

Date de signature du consentement (JJ/MM/AAAA)

Madame : |_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|

Nom (deux premières lettres) : Madame |_|_|_|_|

Date de naissance (MM/AAAA) : Madame |_|_|_|/|_|_|_|_|_| âge |_|_|_| ans

Numéro d'anonymat du couple |_|_|_|_|_|

ENTRETIEN AVEC LE PATIENT

Lieu d'habitation les 10 premières années de vie :

Ville campagne

Si plusieurs lieux d'habitation précisez

Lieu d'habitation durant l'adolescence :

Ville campagne

Si plusieurs lieux d'habitation précisez :

Lieu d'habitation durant la vie adulte :

Ville campagne

Si plusieurs lieux d'habitation précisez :

Données concernant le logement

Lieu d'habitation (résidence principale)

- Centre ville
- Périphérie de la ville
- Village ou Hameau
- Autre, préciser _____
- Ne souhaite pas répondre

Type de logement (résidence principale)

- Maison individuelle
- Appartement
- Maison isolée
- Ne souhaite pas répondre

Si vous avez habité dans différents lieux d'habitation précisez les périodes :

Si vous avez eu plusieurs types de logement précisez les périodes :

Mode de chauffage :

Gaz de ville

Electricité

Fioul

Données relatives à la naissance

Délai nécessaire à concevoir : < 1 an ≥ 1 an

Inconnu

Naissance : A terme Prématurément

préciser le terme si connu : |_|_| SA

Taille à la naissance : |_|_| cm

Poids à la naissance : |_|_|_|_| g

APGAR : |_|_|

Avez-vous pris un traitement au cours de sa grossesse ?

Oui Non Inconnu

Si oui, préciser :

Avez-vous eu des pathologies sévères pendant la grossesse ?

Oui Non Inconnu

Si oui, préciser :

Avez-vous allaité ?

Oui Non Inconnu

Avez-vous fait une ou des fausses couches spontanées ?

Oui Non Inconnu

Si oui, préciser : < 3 ≥ 3 consécutives Inconnu

Antécédents

◇ **Antécédents de consanguinité dans la famille :**

Oui Non Ne sais pas

Si oui, préciser :

◇ **Consanguinité dans le couple :**

Oui Non Ne sais pas

Si oui, préciser :

◇ **Antécédents d'infertilité dans la famille :**

Oui Non Ne sais pas

Si oui, préciser :

◇ **Exposition accidentelle ou régulière (professionnelle par exemple) à des substances toxiques :**

Oui Non

Si oui, préciser dans le tableau ci-dessous :

Type de l'exposition	Durée de l'exposition	Année de fin d'exposition
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __

◇ **Exposition accidentelle ou régulière (professionnelle par exemple) à la chaleur :**

Oui Non

Si oui, préciser dans le tableau ci-dessous :

Type de l'exposition	Durée de l'exposition	Année de fin d'exposition
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __
_____	__ __ ans	__ __ __ __

◇ **Antécédents cardiovasculaires :** Oui Non

Si oui, préciser dans le tableau ci-dessous :

Antécédent	Oui/Non	
Diabète Préciser le type : <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Dyslipidémie (Hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie) Préciser : _____	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Hypertension artérielle	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Autre pathologie cardiovasculaire Préciser : _____	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non

◇ **Antécédents digestifs :** Oui Non

Si oui, préciser dans le tableau ci-dessous :

Antécédent	Oui/Non	
Pathologie digestive Préciser : _____	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Malabsorption (recto-colite hémorragique, maladie de Crohn, maladie coeliaque) Préciser : _____	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non

◇ **Antécédents de cancer :**

Le patient a-t-il présenté un cancer ? Oui Non

Si oui, préciser : _____

Traitements en cours

Le patient a-t-il pris pendant l'année en cours un ou des traitements ?

(Ex : antihistaminiques, psychotropes, anti-asthmatiques, antibiotiques, laxatifs, antalgiques, anti-inflammatoires ...)

Oui Non

Si oui, préciser dans le tableau ci-dessous :

Nom commercial du traitement	Fréquence de la prise	Date de début (MM/AAAA)	Date de fin (MM/AAAA)
_____	_____	____/____ _ _ _ _	____/____ _ _ _ _
_____	_____	____/____ _ _ _ _	____/____ _ _ _ _
_____	_____	____/____ _ _ _ _	____/____ _ _ _ _

Données socio-démographiques

Profession actuelle :

Femme : | _____ | si profession inconnue coché la case

Mode de vie

Travail de jour Travail de nuit Autre, préciser _____

- Nombre de personnes dans le foyer : Adultes : |__|

Enfant(s) : |__| dont |__| enfant(s) vivant en permanence dans le foyer

Niveau d'étude

- Jamais scolarisé Primaire
 Collège Lycée
 Enseignement supérieur, nombre d'années d'études après le baccalauréat : |__| |__|
 Autre, préciser :

Catégorie socio-professionnelle

- Agriculteur / exploitant Employé
 Profession intermédiaire supérieure Cadre ou profession intellectuelle
 Ouvrier Artisan, commerçant, chef d'entreprise
 Autre, préciser _____

Si vous avez exercé plusieurs professions précisez les périodes et lesquelles :

Données concernant les ressources financières

Situation professionnelle actuelle

- En activité
 Au chômage
 Père au foyer
 Autre, préciser : _____

Ressources financières (du patient et par mois)

- Moins de 500 euros De 2 000 à 2 500 euros De 4 000 à 4 500 euros
 De 500 à 1 000 euros De 2 500 à 3 000 euros De 4 500 à 5 000 euros
 De 1 000 à 1 500 euros De 3 000 à 3 500 euros Plus de 5 000 euros
 De 1 500 à 2 000 euros De 3 500 à 4 000 euros Ne souhaite pas répondre

Habitudes et consommation alimentaires

Consommation de boissons

Consommez-vous de l'alcool: Oui

Non

Si oui, préciser la quantité :

Nombre de verre(s) de vin par Jour |__| |__|

Occasionnellement |__| Jamais |__|

Activité physique

Réalisez-vous une activité physique ? Oui

Non

Si oui, préciser laquelle :

Fréquence : Nombre de fois par semaine : |____|

Exposition aux produits toxiques

Votre environnement professionnel est il l'un des métiers suivants ?

- Agriculture
- Horticulture
- Culture maraîchère
- Médecin vétérinaire
- Jardinerie
- Vente (fruits et légumes)
- Désinfection, dératisation ,désinsectisation
- Toilettage animalier ou soins aux animaux
- Elevage

Utilisez-vous des produits phytosanitaires?

Jamais Tous les jours 1 fois par sem. 1 fois par mois

Si oui s'agissait il principalement de :

- Fongicides (traitement contre les champignons)
- D'insecticides (contre les insectes)
- Herbicides (contre les mauvaises herbes)
- Rodenticides, taupicides, corvifuges, etc... (Contre les nuisibles)

Pouvez-vous lister brièvement la liste des produits phytosanitaires utilisés ?

.....
.....

Lors de l'utilisation des produits, vous êtes vous protégé avec :

Des gants Une combinaison Un masque

Au cours de votre vie professionnelle avez-vous été exposé à d'autres toxiques si oui lesquels ?

L'environnement professionnel de vos parents est il l'un des métiers suivants ?

- Agriculture
- Horticulture
- Culture maraîchère
- Médecin vétérinaire
- Jardinerie
- Vente (fruits et légumes)
- Désinfection, dératisation ,désinsectisation
- Toilettage animalier ou soins aux animaux
- Elevage

Vos parents ont-ils utilisé des produits phytosanitaires?

Jamais Tous les jours 1 fois par sem. 1 fois par mois

Si oui s'agissait il principalement de :

- Fongicides (traitement contre les champignons)
- D'insecticides (contre les insectes)
- Herbicides (contre les mauvaises herbes)
- Rodencides, taupicides, corvifuges, etc... (Contre les nuisibles)

Lors de l'utilisation des produits, la personne s'est elle protégé avec :

Des gants Une combinaison Un masque

Activité ludique

Avez-vous l'habitude de jardiner ? Oui Non

Si oui : avant 15 ans Oui Non

Après 15 ans Oui Non

Utilisez-vous :

Des engrais: Oui Non Ne sais pas
 Des Herbicides : Oui Non Ne sais pas

Si oui quelle marque :

Utilisez-vous des produits phytosanitaires dans le jardin privatif ou la cour ?

Oui Non

Si oui lesquels :.....

Si oui sur :

- Un potager
- Des parterres de fleurs
- Des haies
- Autres :.....

Combien de plantes d'intérieur avez-vous :

- Aucune
- De 1 à 5
- Plus de 5

Utilisez-vous des produits d'entretien pour vos plantes d'intérieur :

Oui Non

Si oui lesquels :.....

Si oui les avez-vous appliqués vous-même ?

Oui Non

Environnement proche

Votre logement est-il entouré de jardins (privatifs, publics, ouvriers, etc....) et/ou d'espaces verts ?

Oui Non

Existe-t-il des champs cultivés à moins d'un Km de votre lieu de résidence ?

Oui Non

Si oui quel type de culture :.....

Existe-t-il une autoroute ou un aéroport près de l'habitation ?

Oui Non

Existe-t-il des établissements industriels près de l'habitation ?

Oui Non

Si oui quel type d'industrie :.....

Tabac

Avez-vous déjà fumé :

Oui Non

Si oui et si vous ne fumez plus :

Combien de temps avez-vous fumé : |___| ans

Combien de cigarettes par jour ? |___|

Depuis combien de temps avez-vous arrêté de fumer ? |___| ans

Si vous êtes toujours fumeur :

Dans les 6 derniers mois, quel est votre consommation de tabac :

Nombre de cig/jour |___|

Nombre de cigares/jour |___|

Nombre de cig roulées/jour |___|

Nombre de cig de cannabis ou autres/jour |___|

Dans la semaine qui précède :

Nombre de cig/jour |___|

Nombre de cigares/jour |___|

Nombre de cig roulées/jour |___|

Nombre de cig de cannabis ou autres/jour |___|

A quel moment après le réveil fumez-vous votre première cigarette ?

Moins de 5 minutes 6 à 30 minutes 31 à 60 minutes après 60 minutes

Trouvez-vous difficile de ne pas fumer dans les endroits interdits ?

Oui Non

Quelle cigarette trouvez-vous la plus indispensable ?

La première Une autre

Combien de cigarettes fumez-vous par jour ?

10 ou moins 11 à 20 21 à 30 31 ou plus

Fumez-vous de façon plus rapprochée dans les premières heures après le réveil que pendant le reste de la journée ?

Oui Non

Fumez-vous même si une maladie vous oblige à rester au lit (fièvre, grippe, angine ...)

Oui Non

Avez-vous été exposé au tabagisme passif durant :

Les 10 premières années de vie :

Oui Non

L'adolescence :

Oui Non

La vie adulte :

Oui Non

BILAN CLINIQUE ANNEXE

Données anthropométriques

(Communiquées par le patient)

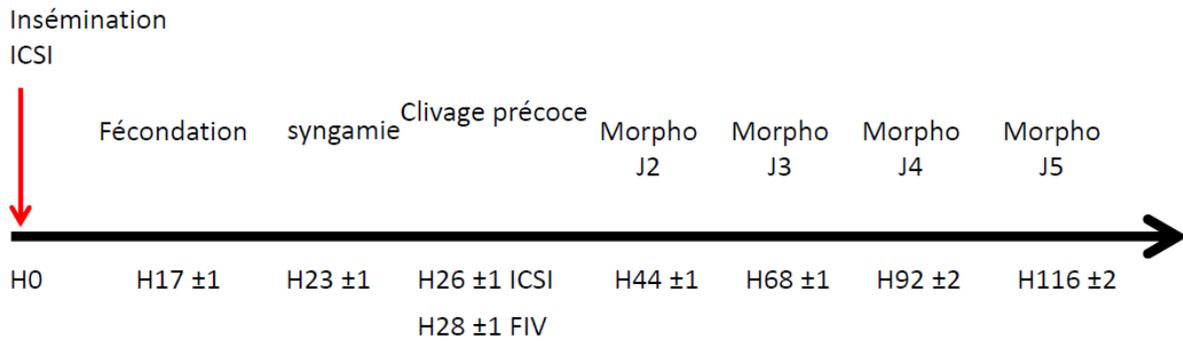
Taille : |_|_|, |_|_|_| m

Poids : |_|_|_|_|, |_|_| kg

IMC : |_|_|_|, |_|_| kg/m² Ne sait pas

Annexe 7 : Cinétique de développement embryonnaire selon la classification d'Istanbul

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens



J1 : 16-18h
2PN : zygote



J1 : 25-27h
**1^{er} clivage
2 cellules ou
blastomères**



J2
4 cellules



J3
8 cellules



16 cellules
Morula



**COMPACTION
Morula compacte**



**CAVITATION
Morula cavitée**

Annexe 8 : Classification embryonnaire au stade blastocyste selon Gardner

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

B1 : Blastocyste précoce (blastocèle < 50% du volume)

B2 : Blastocyste (blastocèle > ou = 50% du volume)

B3 : Blastocyste complet (le blastocèle occupe toute la surface du volume)

B4 : Blastocyste expansé (augmentation de la surface du blastocèle et amincissement de la zone pellucide)

B5 : Blastocyste en éclosion (hernie du trophoctoderme à travers la zone pellucide)

B6 : Blastocyste éclos

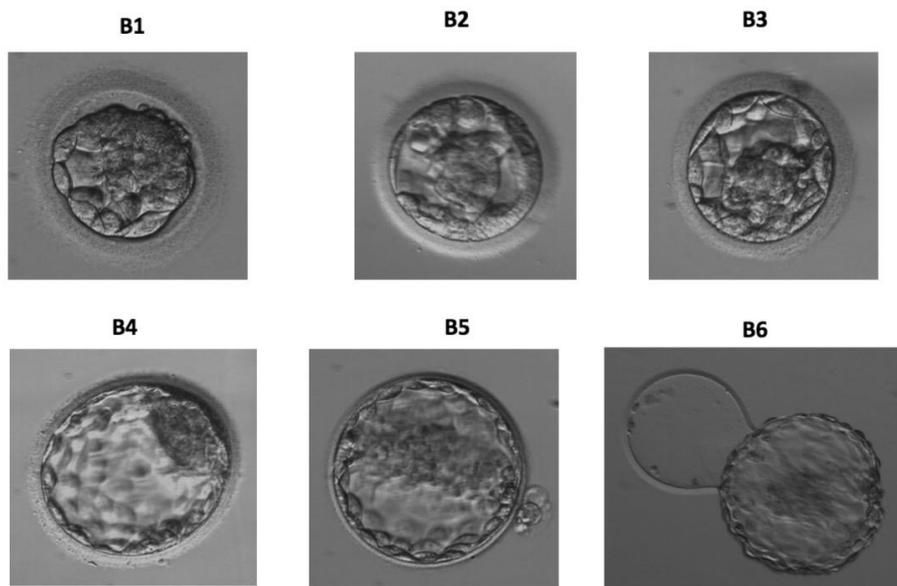
Pour les grades B3 à B6, appréciation de la masse cellulaire interne (bouton embryonnaire) et du trophoctoderme :

Grade	MCI	Trophoctoderme
A	Nombreuses cellules compactes	Epithelium structuré, festonné, nombreuses cellules
B	Cellules lâches	Epithelium intermédiaire
C	Peu de cellules	Epithelium lâche ou lisse, peu de cellules

Annexe 9 : Fiche technique de réalisation des dosages de nicotine et de cotinine

Source : Service de Pharmacologie du CHU d'Amiens

Expansion du blastocyste puis Ecllosion (sortie de la ZP)



DESTINATAIRES

Le personnel du laboratoire de Pharmacologie et des Gaz du sang : les techniciens, les attachés, les internes, les biologistes et les stagiaires.

MOTS CLES

Nicotine, cotinine, GCMS, ASPEC

OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette procédure définit les différentes étapes à suivre lors du dosage de la **nicotine** et de la **cotinine**. Elle concerne les techniciens, les attachés, les internes, les biologistes et les stagiaires du laboratoire de pharmacologie.

Définitions :

Nicotine : alcaloïde, principal composé additif de la fumée de cigarette.

Cotinine : principal métabolite de la nicotine

Abréviations :

GC : Gas Chromatography

MS : Mass spectrometry

REFERENCES :

- Manuel d'accréditation
- Décrets, circulaire bonnes pratiques, normes articles de revues
- Insook Kim, Journal of chromatography B, 814 (2005) 233-240

DESCRIPTION :

1 Principe du dosage :

Après extraction solide/liquide sur cartouche HLB (ASPEC), les échantillons sont injectés puis analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

2 Matériels et réactifs :

2-1 Verrerie :

Tubes à hémolyse 12 x 75 de 6, 8 mL
Tubes de collecte de l'éluât d'extraction
Flacons pour injection de la GC

2-2 Réactifs :

2-2-1 Solvants : Solvants d'extraction par l'ASPEC (bac Symmetry) :

1. Méthanol
2. Eau/Méthanol (95/5)
3. Acétonitrile
4. Acide acétique glacial

2-2-2 Réactifs à préparer :

Solutions mères :

Nicotine 1 mg/mL dans du méthanol
Cotinine 1 mg/mL dans du méthanol
Cotinine d3 1 mg/mL dans du méthanol

Solutions filles :

Dilution au 1/10^e des solutions mères dans du méthanol
Nicotine 100 µg/mL dans du méthanol
Cotinine 100 µg/mL dans du méthanol
Cotinine d3 100 µg/mL dans du méthanol

Solutions de travail

S₀ : pool nicotine-cotinine à **10 µg/mL** dans du méthanol (100 µL des solutions filles nicotine et cotinine à 100 µg/mL + 900 µL de méthanol)

S₁, S₂ et S₃ sont à préparer extemporanément :

S₁ = 100 µL de S₀ + 900 µL H₂O;

S₂ = 100 µL de S₁ + 900 µL H₂O;

S₃ = 100 µL de S₂ + 900 µL H₂O;

Cotinine d3 (**EI**) 10 µg/mL = 100 µL Cotinine d3 100 µg/mL + 900 µL de méthanol (Dilution au 1/10^e dans du méthanol de la solution fille).

3 Mode opératoire :

Le dosage est effectué dans le sérum ou les urines. 1 mL de sérum ou d'urines est nécessaire au dosage.

Préparation de la gamme d'étalonnage et de l'échantillon du patient:

Dans les tubes à hémolyse 12 x 75 de 6, 8 mL mettre :

Concentration (ng/mL)	GAMME D'ETALONNAGE (ng/mL)					
	1	5	10	50	100	500
Sérum ou urine témoin (µL)	900	950	900	950	900	950
Sérum ou urine à doser						
Solution fille S ₀ 10 µg/mL (µL)						50
Solution fille S ₁ 1µg/mL (µL)				50	100	
Solution fille S ₂ 0.1 µg/mL (µL)		50	100			
Solution fille S ₃ 0.01 µg/mL (µL)	100					
Cotined3 EI 10µg/mL (µL)	20	20	20	20	20	20

L'extraction des échantillons par l'ASPEC est pilotée par le logiciel **735 Sampler**.

735 Sampler

- Placer convenablement les tubes d'échantillons à analyser dans le **Rack 32** (aux puits les plus profonds), les tubes en verre de 4 mL dans la zone de collecte, les cartouches d'extraction (Oasis HLB) et le bac des solvants d'extraction (bac symm);
- Vérifier que la quantité des solvants est suffisante dans les flacons (y compris la bouteille d'eau de purge).

Créer la séquence d'extraction

- Démarrer **735 Sampler** ;
- Cliquer sur « Applications », « Fixed Tray », « Nicotine Cotinine » ; sur la barre des menus, cliquer sur « Process », « Remove List », répondre « Yes » à la question « Delete Step ? » ;
- Double-cliquer sur la bande bleue; dans le l'onglet *Method*, sélectionner « Nicotine Cotinine » et le nombre de puits correspondant au nombre d'échantillons à extraire (sélectionner les puits en cliquant sur les petits cercles rouges, maintenir la touche ctrl enfoncée pour sélectionner plusieurs puits) ;
- Cliquer sur « insert », « OK », et sur « Enregistrer » (icône 

- Commencer par une purge avant de démarrer l'extraction; pour cela, cliquer sur l'onglet « Manual Control » et répondre « yes » si la question-*System must be initialized prior to use manual commands. Initialize?*-est posée, si ce n'est pas le cas tant mieux !
- Cliquer sur « Purge » et attendre 2 cycles d'aspirations et de refoulements avant de re cliquer sur le même bouton pour stopper la purge ;
- Revenir sur la séquence déjà créée en cliquant sur l'onglet « 1 »;
- Cliquer sur le bouton  pour démarrer l'extraction (Environ 12 minutes/extraction);
- Après extraction, mettre dans chaque éluât, 40 µL d'acide acétique glacial avant d'évaporer;
- Evaporer à sec à températures (20-25°C) sous courant d'azote, ⚠! à ne pas trop sécher;
- Reprendre l'extrait sec avec 50 µL d'acétate d'éthyle;
- Transférer dans des flacons pour injection automatique au GCMS-QP 2010.

NB :

- Injection 2µL

- Limite de quantification 1 ng/mL pour la nicotine et 2 pour la cotinine

EVALUATION :

HISTORIQUE DU DOCUMENT :

REDACTION, VERIFICATION, APPROBATION :

Rédacteurs : Sadio SAGNA FFI Date et visa :	Vérificateurs : AS Lemaire-Hurtel PH à titre provisoire Date et visa :	Approbateurs : La DQA Date et visa :
--	---	---

Annexe 10 : Technique de fragmentation de l'ADN spermatique

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

1. OBJET DE L'ANALYSE

Mettre en évidence la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Selon le degré de fragmentation, les résultats de la reproduction assistée peuvent être altérés (ICSI). Les spermatozoïdes avec un ADN altéré peuvent également augmenter le risque d'anomalies chez les nouveaux nés ainsi que le risque de cancer de l'enfant.

2. ABREVIATIONS

TdT : terminal deoxynucléotidyl transférase

TMS : Test de migration survie

UTP : deoxyuridine triphosphate

3. ETAPE PRE-ANALYTIQUE : NATURE ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Après recueil du sperme, il sera fait une sélection des spermatozoïdes par TMS. La procédure est la suivante :

Après avoir amené les solutions à température ambiante, il sera préparé à partir du Puresperm®100, une solution de Puresperm® à 80% et une autre à 40%. A l'aide d'une pipette à pointe stérile, il sera déposé 2 ml de Puresperm® à 80% dans un tube à centrifuger conique, puis avec une autre pipette stérile, il sera déposé avec précaution 2 ml du Puresperm® à 40% sur la précédente phase. Enfin, à l'aide d'une pipette stérile, il sera déposé soigneusement jusqu'à 1.5ml de sperme liquéfié sur Puresperm®.

Centrifuger ensuite pendant 20 minutes à 1300 tours par minute.

A l'aide d'une pipette stérile aspirer dans un mouvement circulaire en surface tout sauf le culot et les 6 derniers 6 mm de Puresperm® à 80%. Utiliser une pipette stérile pour aspirer le culot et le transférer dans un nouveau tube et le remettre en suspension dans 5 ml de milieu de rinçage (ferticult) et centrifuger pendant 10 minutes à 2000 tours par minute. Aspirer le surnageant et remettre en suspension dans un volume adéquat pour obtenir la concentration requise.

4. PRINCIPE

Ce test consiste à visualiser les fragments d'ADN simple brin ou double brin par fixation d'un UTP (deoxyuridine triphosphate) couplé à un fluorochrome (FITC) à l'aide de l'enzyme la terminal deoxynucléotidyl transférase (TdT). Ces fragments d'ADN sont révélateurs de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

5. MATERIELS ET REACTIFS

5. 1 MATERIELS

- tubes coniques de 1.5 ml
- étuve à 37°C
- centrifugeuse
- plaque chauffante à 37°C
- chambre humide
- pipetman

- pointes à filtre
- lames de verre
- lamelles de verre 18x18

5. 2 REACTIFS

- PBS
 - Solution de fixation : **glutaraldehyde 3% PBS** (mettre 12 ml de glutaraldehyde 25% dans 88ml de PBS)
 - Solution de perméabilisation : 0.1% Triton X-100 in 0.1% de sodium citrate
- Solution de marquage TUNEL : 10µl de mélange réactionnel de TUNEL par lame contenant 1µl d'enzyme et 9µl de solution de marquage.

6. CALIBRATION

NA

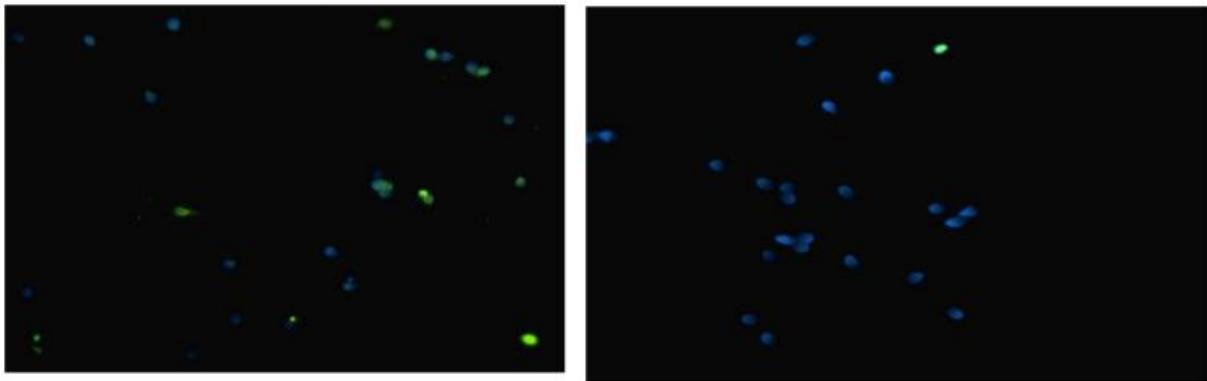
7. ETAPES DE L'ANALYSE

Pour chaque échantillon, des contrôles positifs et négatifs sont réalisés. Pour le contrôle négatif, l'enzyme TdT a été omise. Le contrôle positif est obtenu par l'incubation des spermatozoïdes avec 1000 UI DNaseI/ml pendant 15 minutes à 37°C dans du tampon de réaction avant la réaction de marquage.

- Le sperme est récupéré à partir d'un éjaculat frais ou congelé.
- Le sperme après TMS est mélangé à 1ml de PBS (solution de lavage) dans un tube conique de 1.5ml.
- Centrifuger pendant 10 min à 1200 tours par min (rpm).
- Renouveler cette étape
- Ajouter 250µL de PBS.
- Une goutte d'échantillon (25µl) est déposée sur une lame et disposée à l'horizontal sur la plaque chauffante à 37°C jusqu'à ce qu'elle soit sèche.
- Si l'échantillon n'est pas assez riche redéposer une ou plusieurs gouttes afin d'avoir suffisamment de spermatozoïdes flagellés. Si l'échantillon est riche diluer l'échantillon au PBS.
- Une fois sèche, la lame est recouverte de solution de perméabilisation pendant 5 min à 4°C
- La lame est égouttée.
- Déposer 1 mL de solution de fixation pendant 30min à température ambiante et sous hotte.
- La lame est rincée 3 fois dans le PBS dans une cuve en verre sous agitation: 3 x 5 min
- Laisser sécher la lame.
- Effectuer le contrôle positif : déposer 10µl de solution de DNaseI à 1000U/ml dans le tampon de réaction et recouvrir d'une lamelle 18x18 pendant 15 minutes à 37°C. Pour le contrôle négatif déposer 10µl de PBS et recouvrir d'une lamelle.
- Marquage TUNEL : 10µl de solution de marquage TUNEL est déposée sur la lame et recouverte d'une lamelle 18X18. Pour le contrôle négatif, ajouter 10µl de solution de marquage sans enzyme et recouvrir d'une lamelle 18x18.
- La lame est placée à 37°C pendant 30 minutes dans l'obscurité et à l'humidité.
- La lame est rincée 3 fois dans le PBS dans une cuve en verre sous agitation: 3 x 5 min.

- 8µl de DAPI antiFad sont déposés et une lamelle de 18x 18 est déposée sur la lame.
- La lame est lue au microscope à fluorescence ; filtre DAPI et FITC (bleu et vert). Objectif à immersion.
- Compter 200 spermatozoïdes flagellés au total.
- Rendu des résultats en % de fragmentation: (nombre de spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté/ nombre de spermatozoïdes totaux)x 100.
- **8. CONTROLE DE QUALITE**

Photos prises au microscope à fluorescence avec le filtre DAPI et FITC :

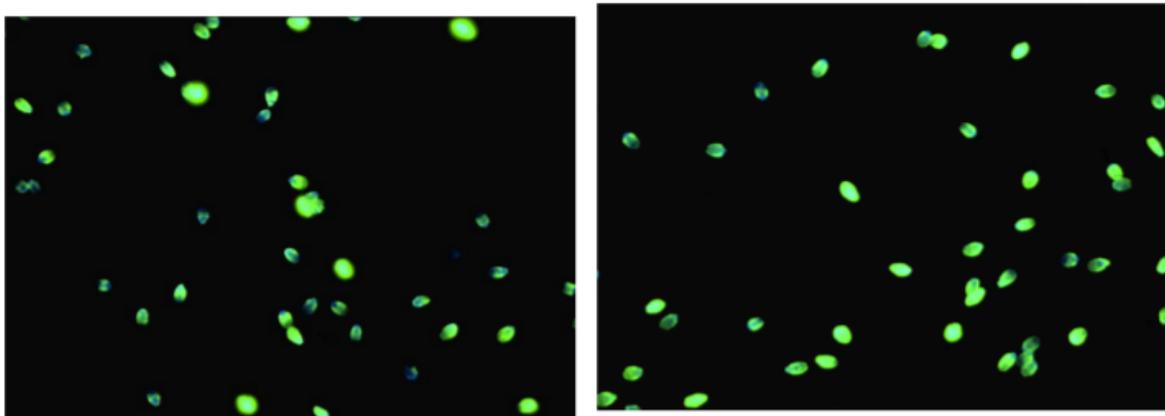


2 images du contrôle négatif de Mr F: traitement avec la solution de TUNEL sans la transférase.

En bleu (DAPI): les noyaux

En vert (FITC) : ADN fragmentés

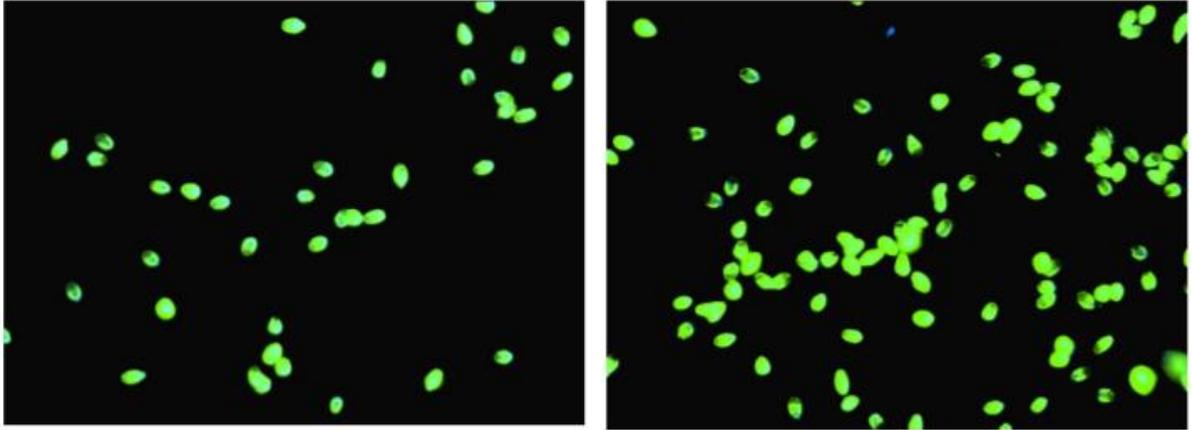
Rq : petits points verts très lumineux = artefacts



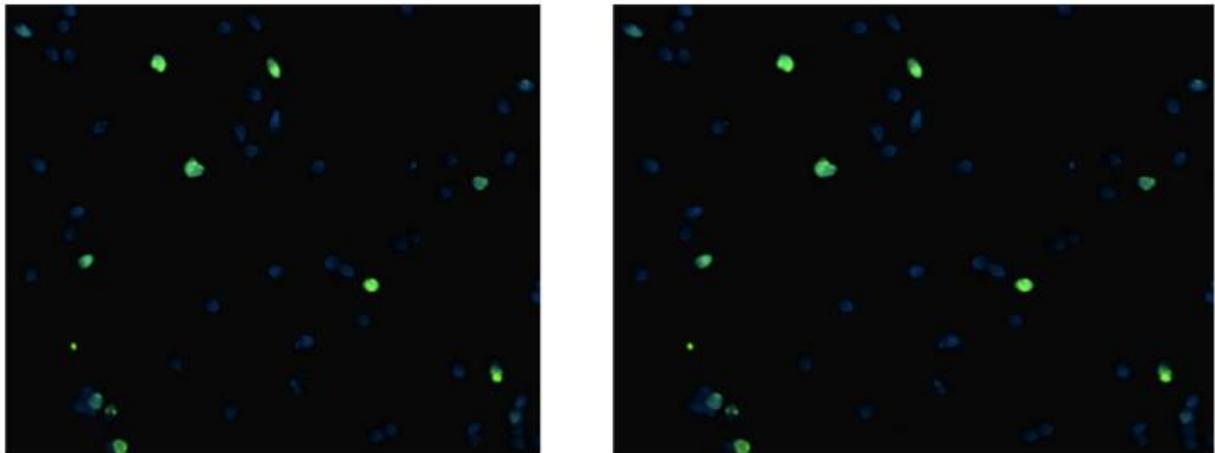
2 images du contrôle positif de Mr F : traitement de l'échantillon avec 100U/ml de DNaseI

En bleu (DAPI): les noyaux

En vert (FITC) : ADN fragmentés



2 images du contrôle positif de Mr F : traitement de l'échantillon avec 1000U/ml de DNaseI
 En bleu (DAPI): les noyaux
 En vert (FITC) : ADN fragmentés



2 images du test TUNEL de Mr F : traitement avec la solution de TUNEL avec la transférase
 En bleu (DAPI): les noyaux
 En vert (FITC) : ADN fragmentés

% de fragmentation de Mr F : 16%.

Remarques : 3 spermés de patients (Mr F, Mr B et Mr T) ont été analysés avec comme protocole :
 Traitement avec la DNase I en utilisant la gamme de concentration: 1 ; 10 ; 100 et 1000 U/ml
 Puis
 Traitement avec la solution de TUNEL selon les recommandations du fournisseur.
 Les résultats sont classés sur CytoVision.

9. VERIFICATION ANALYTIQUE

10 ETAPE POST-ANALYTIQUE

Transcription des résultats de la feuille de travail sur DxLab et validation biologique.
Une copie des résultats est adressée au prescripteur et une autre au patient.
La feuille de travail est rangée dans le dossier du couple.

11. ELIMINATION DES DECHETS – SECURITE

Pour l'élimination des déchets, [CHUPROC0155](#) « Tri et élimination des déchets »
Pour les fiches de données de sécurité (FDS), [CHU-MO0129](#) « Fiches de données de sécurité » et FDS des réactifs.

12. DOCUMENTS ASSOCIES ET REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Accueil du patient au laboratoire en vue d'un recueil de sperme [CHU-MO0230](#)
Test de Migration Survie [CHU-FAN0144](#)
Tri et élimination des déchets [CHUPROC0155](#)
Méthode d'analyse – Processus analytique [CHUPROC0378](#)
Fiches de données de sécurité [CHU-MO0129](#)

13. REDACTION, VALIDATION ET APPROBATION

Groupe de travail :

Noms et fonctions des signataires	Dates de signature
Rédaction	
Marlène GALLET , MCU-PH	07/11/2016 09:14:00
Validation	
Naïma BELHADRI-MANSOURI, PH	12/11/2016 14:39:32
Moncef BEN KHALIFA MCU-PH	07/11/2016 11:46:23
Label Qualité	
Ingénieur qualité, Pôle Efficience et Qualité	16/11/2016 17:55:24

Annexe 11 : Technique de détermination de l'indice de dénaturation de l'ADN spermatique

Source : Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Amiens

1. OBJET DE L'ANALYSE

Mettre en évidence la condensation de l'ADN des spermatozoïdes par le bleu d'aniline. Selon le degré de décondensation de la chromatine, les résultats de la reproduction assistée peuvent être altérés (FIV ou ISCI).

La SDI : Sperm condensation index, analyse de l'indice de dénaturation de l'ADN des spermatozoïdes.

Au cours de la spermiogenèse, le remplacement de la majorité des histones par protamines (processus de protamination) permet aux spermatozoïdes d'acquérir une chromatine hautement condensée.

Cette condensation ou compaction est nécessaire à la protection du génome paternel au cours du transit du spermatozoïde dans les voies génitales (protection contre les agents endogènes et exogènes : nucléase, ROS, agents mutagènes...) ainsi que dans les différentes phases de progression au cours de la fécondation. Des anomalies de la condensation de la chromatine peuvent entraîner des altérations de l'ADN (fragmentation).

Des anomalies de condensation de l'ADN spermatique peuvent avoir un impact sur la fécondation et le développement embryonnaire précoce.

Indications

Les indications ne sont pas encore codifiées, celles proposées sont :

- Bilan des infertilités « idiopathiques »
- Echec de 3 IUI pour décider d'une orientation en FIV ou en ICSI
- Echecs de 2 tentatives de FIV/ICSI avec transfert d'embryons de bonne qualité
- Bilan avant la mise sous traitement antioxydant
-

2. ABREVIATIONS

SDI : Sperm Denaturation Index

3. ETAPE PRE-ANALYTIQUE : NATURE ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Après recueil du sperme, il sera fait un TMS.

Après avoir amené les solutions à température ambiante, il sera préparé à partir du Puresperm®100, une solution de Puresperm® à 80% et une autre à 40%. A l'aide d'une pipette à pointe stérile, il sera déposé 2 ml de Puresperm® à 80% dans un tube à centrifuger conique, puis avec une autre pipette stérile, il sera déposé avec précaution 2 ml du Puresperm® à 40% sur la précédente phase. Enfin, à l'aide d'une pipette stérile, il sera déposé soigneusement jusqu'à 1.5ml de sperme liquéfié sur Puresperm®.

Centrifuger ensuite pendant 20 minutes à 1300 tours par minute.

A l'aide d'une pipette stérile aspirer dans un mouvement circulaire en surface tout sauf le culot et les 6 derniers 6 mm de Puresperm® à 80%. Utiliser une pipette stérile pour aspirer le culot et le transférer dans un nouveau tube et le remettre en suspension dans 5 ml de milieu de rinçage (fertilcult) et centrifuger pendant 10 minutes à 2000 tours par minute. Aspirer le surnageant et remettre en suspension dans un volume adéquat pour obtenir la concentration requise.

4. PRINCIPE

Le bleu d'aniline colore sélectivement les histones riches en lysine et non les protamines riches en arginine et cystéine. Le colorant est donc un marqueur de l'immaturation des spermatozoïdes. L'analyse porte sur 200 têtes spermatozoïdes si possible. La proportion de têtes colorées en bleu foncé (chromatine décondensée) est évaluée par microscopie en lumière blanche.

Spermatozoïdes coloré en bleu clair : chromatine condensée.

Spermatozoïdes coloré en bleu foncé : chromatine décondensée.

5. MATERIELS ET REACTIFS

5.1 MATERIELS

- tubes coniques de 1.5 ml
- étuve à 37°C
- centrifugeuse
- pipetman
- pointes à filtre
- lames de verre

5.2 REACTIFS

- PBS
- Solution 1 : perméabilisation (pour 10ml de citrate de sodium 1% ajouter 10µl de triton X (ou SDS)
- Solution 2 : fixation : **glutaraldehyde 3% PBS** (mettre 12 ml de glutaraldehyde 25% dans 88ml de PBS)
- Solution 3 : coloration : bleu d'aniline : (mettre 4ml d'acide acétique dans 96 ml d'eau (solution A) puis ajouter 5g de bleu d'aniline(Annexel) à la solution A

Eau distillée

6. CALIBRATION

NA

7. ETAPES DE L'ANALYSE

Préparation et perméabilisation

- Le sperme est récupéré à partir d'un éjaculat frais ou congelé.
- Le sperme après TMS est mélangé à 1ml de PBS (solution de lavage) dans un tube conique de 1.5ml.
- Centrifuger pendant 10 min à 1200 tours par min (rpm).
- Renouveler cette étape
- Ajouter 250µL de PBS.
- Une goutte d'échantillon (25µl) est déposée sur une lame et disposée à l'horizontal sur la plaque chauffante à 37°C jusqu'à ce qu'elle soit sèche.
- Si l'échantillon n'est pas assez riche redéposer une ou plusieurs gouttes afin d'avoir suffisamment de spermatozoïdes flagellés. Si l'échantillon est riche diluer l'échantillon au PBS.
- Une fois sèche, la lame est recouverte de solution de perméabilisation pendant 5 min à 4°C
- La lame est égouttée.
- Déposer 1 ml de solution de fixation pendant 30min à température ambiante et sous hotte.

- La lame est rincée 3 dans la PBS dans une cuve en verre sous agitation: 3 x 5 min

Coloration

- Ajouter 1ml de solution 3 diluée au ½.
- Colorer 10 minutes à température ambiante.
- Rincer la lame à l'eau distillée et stocker dans une boîte de lame.

Lecture

- En lumière blanche à l'objectif x 63 ou x100 à immersion.
- Lire la lame et calculer le pourcentage des spermatozoïdes colorés en bleu foncé (chromatine décondensée) sur un total de 200 spermatozoïdes.

8. CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle interne de qualité sera mis en place par lecture de lame.

9. VERIFICATION ANALYTIQUE

La lecture des lames si elles sont bien colorées et lisibles ou pas.

10 ETAPE POST-ANALYTIQUE

Transcription des résultats de la feuille de travail sur DxLab et validation biologique.

Une copie des résultats est adressée au prescripteur et une autre au patient.

La feuille de travail est rangée dans le dossier du couple.

11. ELIMINATION DES DECHETS – SECURITE

Pour l'élimination des déchets, [CHUPROC0155](#) « Tri et élimination des déchets »

Pour les fiches de données de sécurité (FDS), [CHU-MO0129](#) « Fiches de données de sécurité » et FDS des réactifs.

12. DOCUMENTS ASSOCIES ET REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Accueil du patient au laboratoire en vue d'un recueil de sperme [CHU-MO0230](#)

Test de Migration Survie [CHU-FAN0144](#)

Tri et élimination des déchets [CHUPROC0155](#)

Méthode d'analyse – Processus analytique [CHUPROC0378](#)

Fiches de données de sécurité [CHU-MO0129](#)

13. REDACTION, VALIDATION ET APPROBATION

Groupe de travail :

Noms et fonctions des signataires	Dates de signature
Rédaction	
Marlène GALLET , MCU-PH	09/11/2016 13:10:48
Validation	
Naïma BELHADRI-MANSOURI, PH	12/11/2016 14:46:34
Moncef BEN KHALIFA, MCU-PH	10/11/2016 08:32:15
Label Qualité	
Ingénieur qualité, Pôle Efficience et Qualité	16/11/2016 17:55:04

