



**HAL**  
open science

# Exposition prénatale aux perturbateurs endocriniens et risque sur le neurodéveloppement : étude de fratries exposées au diéthylstilbestrol

Fabrice Rivollier

► **To cite this version:**

Fabrice Rivollier. Exposition prénatale aux perturbateurs endocriniens et risque sur le neurodéveloppement : étude de fratries exposées au diéthylstilbestrol. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01213114

**HAL Id: dumas-01213114**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01213114>**

Submitted on 7 Oct 2015

**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.

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2015

N°7

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Exposition prénatale aux perturbateurs endocriniens et  
risque sur le neurodéveloppement : étude de fratries  
exposées au diéthylstilbestrol

Présentée et soutenue publiquement  
le 6 février 2015

Par

***RIVOLLIER, Fabrice***

Né le 14 octobre 1986 à Fontenay-aux-Roses (92)

Dirigée par M. Le Docteur Kebir, Oussama, PH

Jury :

Mme Le Professeur Krebs, Marie-Odile, PU-PH ..... Président

M. Le Professeur Jouvent, Roland, PU-PH ..... Membre

M. Le Docteur Lemogne, Cédric, MCU-PH ..... Membre

## Remerciements

À ma présidente de Jury, Madame le Professeur KREBS, pour m'avoir transmis votre intérêt pour un sujet passionnant. Pour votre écoute, votre temps, votre disponibilité. Pour ce semestre qui a compté tout particulièrement. Soyez assuré de mon profond respect.

Aux membres du Jury :

Monsieur le Professeur JOUVENT, pour ces six mois dans votre service, pour ces séances de bibliographies, pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

Monsieur le Docteur LEMOGNE, pour ce semestre en cours, pour m'avoir confirmé mon intérêt pour la psychiatrie de liaison, pour la transmission de toutes ces connaissances. Merci infiniment d'avoir accepté de participer à cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère considération.

À mon directeur de thèse, Monsieur le Dr KEBIR, pour toute cette année passée, et pour tous les travaux à venir. Merci de ton écoute et de ta gentillesse. Merci pour tout ce que tu m'as transmis.

À mes parents, pour avoir toujours cru en moi.

À Nicolas, pour tout ce que tu sais.

À Florence, mon amie, ce que la médecine m'a apporté de meilleur.

À mes co-internes, devenus amis, Audrey, Marie, Julien M., Alexandre, Julien Y., Émilie, Léa, Sarah et Christophe.

À mes co-externes, qui sont toujours là, Anne, Romain, Virginie, Camille, Yohan, Lise, Kessara, Constance et Clara.

À mes chefs de service et maître d'internat, Monsieur le Pr PERETTI, Monsieur le Dr MASSE, Monsieur le Pr GOLSE, Madame le Pr MOUREN, Monsieur le Pr OLIE, Monsieur le Pr LÔÔ et Monsieur le Pr GAILLARD.

À mes PH et chefs de cliniques, le Dr MOUCHABAC, Dr GLÜCK, le Dr CHOUCHA, le Dr GIRAUD, le Dr PLAZE, le Dr MACHEFAUX, le Dr GAILLARD, le Dr MARTINEZ, le Dr GAY, le Dr BOURGIN, le Dr PEYRE, le Dr ACQUAVIVA, le Dr HUBERT, le Dr AIRAGNES et le Dr LEBEAU.

À mon équipe INSERM, le Dr JAY, Adam, Cléo et Boris.  
A tous ceux qui comptent.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Perturbateurs endocriniens : définition. ....</b>	<b>6</b>
a/ Définition d'une hormone .....	7
b/ Définition d'un perturbateur endocrinien .....	9
<b>2. Perturbateurs endocriniens : Modes d'action, effets divers connus sur la santé humaine. ....</b>	<b>11</b>
a/ Un enjeu actuel.....	11
b/ Une exposition ubiquitaire.....	12
c/ Effets sur la reproduction.....	13
d/ Effets sur le métabolisme.....	14
e/ Effets sur l'immunité .....	15
f/ Des fenêtres d'exposition critiques .....	16
<b>3. L'exemple du diethylstilbestrol (Distilbène®).....</b>	<b>20</b>
a/ Historique.....	20
b/ Effets gynécologiques.....	23
c/ Effets psychiatriques .....	26
1. Revue de la littérature.....	26

2. Phénotypes proposés .....	29
3. Limites méthodologiques .....	29
4. Mécanismes sous-jacents .....	30
d/ Diethylstilbestrol et cancers .....	30
e/ Effets divers .....	31
<b>4. Epigénétique et psychiatrie .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Objectifs de l'étude .....</b>	<b>40</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>41</b>
<b>1. Recrutement .....</b>	<b>41</b>
a/ Principes du recrutement .....	41
b/ L'association Hhorages .....	42
<b>2. Phénotypage .....</b>	<b>42</b>
<b>3. Profil de méthylation .....</b>	<b>44</b>
a/ Réalisation de la puce de méthylation .....	44

1. Traitement au bisulfite.....	45
2. Amplification ADN de génome entier .....	45
3. Hybridation.....	46
4. Fluorescence et scannage de la puce .....	46
b/ Analyse des données de méthylation .....	46
1. Normalisation des données.....	47
2. Recherche d'un modèle .....	48
3. Etude par gène .....	48
4. Choix du modèle : QQPlots.....	49
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>51</b>
<b>1. Diagnostics psychiatriques.....</b>	<b>51</b>
<b>2. Données neurodéveloppementales .....</b>	<b>53</b>
<b>3. Données sur la méthylation de l'ADN .....</b>	<b>55</b>
a/ Niveau de méthylation global entre exposés et non-exposés.....	55
b/ Niveaux de méthylation spécifiques par CpG ou par gène entre exposés et non-exposés. ....	56
1. Analyses de réseaux .....	58
2. Carte des variations de méthylation .....	61
3. Analyses par fratries .....	62

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>66</b>
-------------------------	-----------

<b>1. Perturbateurs endocriniens et neurodéveloppement .....</b>	<b>66</b>
--	-----------

a/ Arguments pour une perturbation du neurodéveloppement.....	67
---	----

b/ Arguments pour une perturbation des fonctions cognitives .....	67
---	----

c/ Arguments pour une perturbation des aspects comportementaux .....	68
--	----

d/ Mécanismes sous-jacents évoqués.....	69
---	----

<b>2. Théorie de la perturbation endocrinienne dans la schizophrénie. ....</b>	<b>71</b>
--	-----------

<b>3. Etudes épigénétiques .....</b>	<b>75</b>
--------------------------------------	-----------

<b>4. Perspectives de recherche .....</b>	<b>78</b>
---	-----------

<b>5. Limites.....</b>	<b>80</b>
------------------------	-----------

<b>6. Troisième génération.....</b>	<b>82</b>
-------------------------------------	-----------

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>85</b>
------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>87</b>
----------------------------	-----------

## **INTRODUCTION**

### **1. Perturbateurs endocriniens : définition.**

## a/ Définition d'une hormone

Une hormone est une substance biochimique produite par l'organisme au sein de cellules spécifiques, de glandes ou de tissus, transportée le plus souvent par voie sanguine, et susceptible d'influer sur différentes composantes physiologiques ou comportementales tels que la digestion, la reproduction, le métabolisme, la croissance ou l'humeur (figure 1).

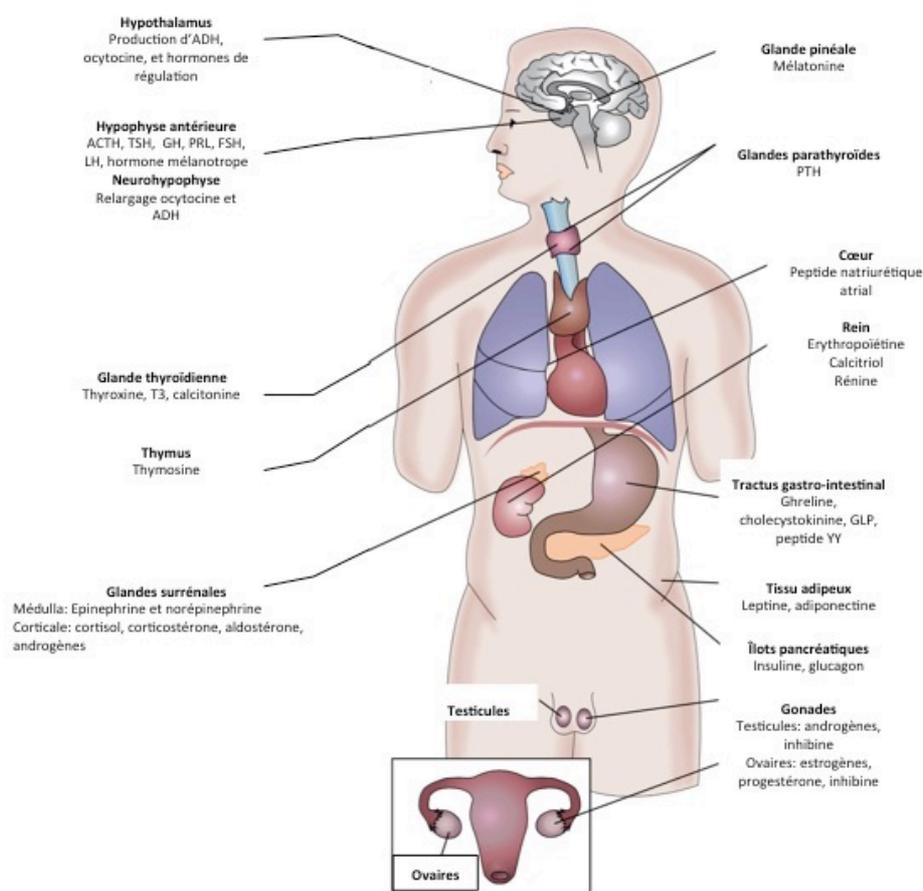


Figure 1. Les hormones sont des molécules produites par des cellules spécialisées dans une large variété de glandes et de tissus. Ces molécules sont transportées par le sang pour, parfois, produire des effets à distances. Figure traduite du rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2013 sur les perturbateurs endocriniens.

Le terme d'hormone « endocrine » est employé pour des molécules directement sécrétées dans la circulation sanguine, par opposition aux hormones « exocrines » sécrétées via des canaux ou ducts (figure 2). Relayant, comme le système nerveux, des informations

capitales aux différents organes, le système endocrinien peut être considéré comme un système informatif aux caractéristiques bien précises.

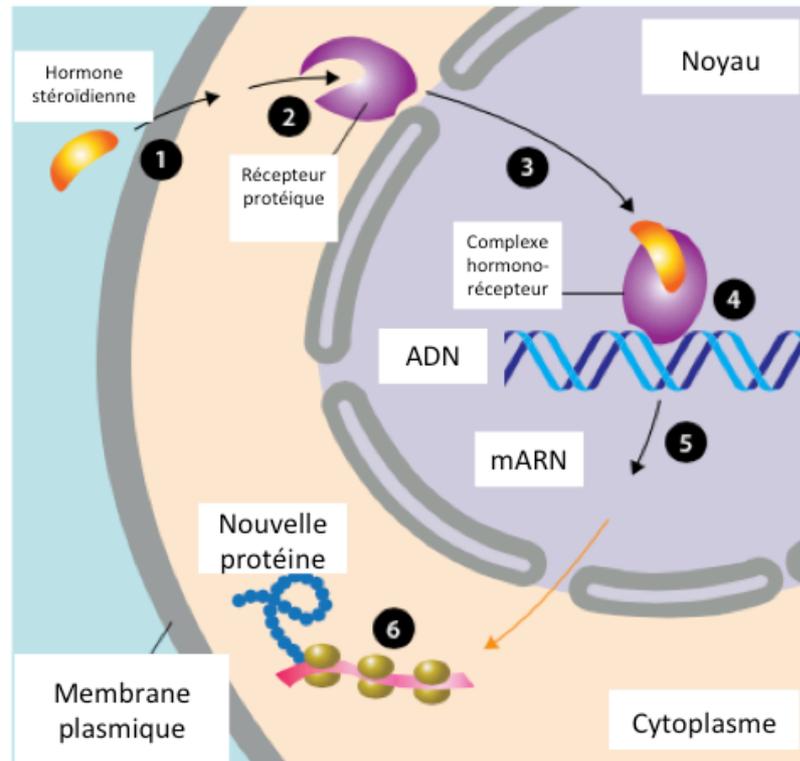


Figure 2. Les hormones produisent leur effet en se liant à des récepteurs. Ceux-ci appartiennent à différentes classes. Ici, des récepteurs nucléaires sont liés par des hormones stéroïdiennes et agissent directement sur la régulation de l'expression génique. Figure traduite du rapport de l'OMS de 2013 sur les perturbateurs endocriniens.

Le système hormonal a été observé chez tous les organismes multicellulaires. Si elles sont avant tout définies fonctionnellement, les hormones présentent des caractéristiques chimiques très différentes. Chez les vertébrés, trois principales classes ont ainsi pu être décrites :

- Les hormones peptidiques, composées d'acides aminés : hormone thyroïdienne, hormone de croissance, insuline, hormone folliculo-stimulante, thyroïdostimuline...
- Les monoamines, dérivées d'acides aminés aromatiques : catécholamines, sérotonine, mélatonine...

- Les hormones dérivées des lipides ou phospholipides, dont la catégorie principale regroupe les hormones stéroïdiennes : testostérone, cortisol...

De nombreux composants chimiques exogènes, naturels ou de synthèse, peuvent avoir des effets hormono-mimétiques chez l'homme et dans la vie animale. Interférant avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou l'élimination des hormones naturelles, ils sont à même de modifier l'homéostasie, la reproduction et/ou le comportement.

Ainsi, de nombreuses hormones et leurs analogues sont utilisés en thérapie. Les plus répandues sont les hormones stéroïdiennes de synthèse, parmi lesquelles les œstrogènes et les progestagènes, mais aussi les androgènes, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes.

## **b/ Définition d'un perturbateur endocrinien**

De façon plus générale, on parle aujourd'hui de perturbateur endocrinien pour toute molécule chimique exogène interférant avec le système endocrine, et résultant en des effets adverses sur la santé d'un individu, ou de ses enfants, au préalable bien portants. Ce terme fut utilisé pour la première fois à la conférence de Wingspread au Wisconsin en 1991<sup>1</sup>. Ces perturbateurs regroupent non seulement des médicaments, mais aussi des pesticides ou des composants utilisés dans l'industrie du plastique et dans les produits de grande consommation. Dans la première moitié des années 90, des études ont pu souligner des effets permanents de ces composants sur le développement. Dans le cas de la médication, un exemple probant des conséquences d'un perturbateur endocrinien a pu être étudié suite aux prescriptions de diethylstilbestrol (Distilbène®) durant le XX<sup>ème</sup> siècle.

Du fait d'une meilleure compréhension de leurs modes d'actions, de plus en plus de produits sont aujourd'hui qualifiés de perturbateurs endocriniens. Il n'en existe pas à ce jour de classification officielle. Ils peuvent être ainsi classés par mécanismes d'actions ou par classes de produits.

Produits chimiques industriels	Polychlorobiphényle (PCB), pentachlorophénol (PCP), bisphénol A, dioxines, furane, acide phtalique (PAE), nonylphénol, alkyphénol, benzopyrène, 2,4-dichlorophénol.
Pesticides, herbicides et fongicides	Atrazine, alachlore, dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), endosulfane, heptachlore, lindane, hexachlorobenzène, nitro-fène, chlrodane, malathion.
Métaux lourds	Cadmium, plomb, mercure.
Hormones de synthèse	17- $\alpha$ ethynil-estradiol, diethylstilbestrol.
Alimentation	Phytoestrogènes

Tableau 1. Classification des principaux perturbateurs endocriniens

Le bisphénol A, que nous réévoquerons plus tard, est un composé organique résultant de la fusion entre un acétone et un phénol. Il est extrêmement présent dans notre environnement. Il est notamment utilisé comme monomère de résines époxydes, retrouvé à l'intérieur de canettes et boîtes de conserve. Il sert aussi à la confection de polycarbonates (matière plastique utilisée dans les verres optiques, CDs, biberons). On le retrouve également dans les tickets de caisse, et les billets de banque, comme révélateur de coloration à l'impression. La loi n°21010-729 du 30 juin 2010, tendant à suspendre la commercialisation de biberons produits à base de bisphénol A, a récemment été modifiée. De nouvelles mesures applicables au 1<sup>er</sup> janvier 2015 rentrent en compte dorénavant : la loi n°2012-1442 vise maintenant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A.

Les polychlorobiphényles (PCBs) sont d'autres perturbateurs endocriniens très médiatisés. Ce sont des composés aromatiques organochlorés synthétisés dans l'industrie. Ils furent massivement utilisés des années 30 aux années 70 comme isolants électriques (transformateurs électriques, fours micro-ondes, peintures). Leur exposition principale est au-

jourd'hui alimentaire (poisson, viande, œufs, produits laitiers). En France, la fabrication et l'utilisation de produits utilisant du PCB sont interdites depuis 1987. Les émissions ont beaucoup diminuées, néanmoins une accumulation importante est encore aujourd'hui observée dans certains milieux comme dans la vie aquatique. Dans un rapport sanitaire de l'InVS publié le 14 mars 2011, 3,6% des femmes en âge de procréer présentaient un taux de PCBs sanguins supérieurs à 700 ng/g de lipides, seuil défini par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

## **2. Perturbateurs endocriniens : Modes d'action, effets divers connus sur la santé humaine.**

Depuis plus d'une dizaine d'années, un effort scientifique intense a permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens sur l'Homme et sur la vie sauvage. En 2002, un programme commun de l'OMS et de l'UNEP (*United Nations Environment Program*), le *Global Assessment of the State-of-Science of Endocrine Disruptors* concluait qu'« il est clair que certains composés chimiques environnementaux puissent interférer avec les systèmes hormonaux physiologiques », mais qu'« il n'y a que de faibles preuves en faveur d'une altération de la santé secondaire à l'exposition à des composés chimiques hormono-mimétiques ». En 2013, suite aux progrès scientifiques importants dans le domaine, les conclusions de ces mêmes organisations seront tout à fait différentes.

### **a/ Un enjeu actuel**

L'incidence des maladies liées au système endocrinien est en ascension. Les études sur l'homme ne montrent que des associations entre exposition à un perturbateur endocrinien et phénotype pathologique, et non des rapports de cause à effet. En effet, du fait de la

complexité des maladies et des expositions durant une vie entière, il est particulièrement difficile d'être certain qu'une exposition donnée engendrera une maladie spécifique.

<b>Système reproductif/endocrine</b>	<b>Système cardio-pulmonaire</b>
Cancer du sein/prostate	Asthme
Endométriose	Maladies cardio-vasculaires/hypertension
Infertilité	Infarctus du myocarde
Diabète/syndrome métabolique	
Puberté précoce	
Obésité	
<b>Système immunologique</b>	<b>Système nerveux</b>
Susceptibilité aux infections	Maladie d'Alzheimer
Maladies auto-immunes	Maladie de Parkinson
	TDAH, troubles de l'apprentissage

Tableau 2. Maladies associée à l'exposition aux perturbateurs endocriniens durant le développement. TDAH : trouble déficit de l'attention/hyperactivité.

## **b/ Une exposition ubiquitaire**

Plus de huit cent produits chimiques sont suspectés d'interférer avec les hormones endocriniennes, leur synthèse, ou leur conversion. Ces produits peuvent être naturels ou créés par l'Homme. On les retrouve notamment parmi les polluants organiques persistants, les pesticides, les phytoestrogènes, les métaux, les produits pharmaceutiques, les additifs, les produits de beauté, les plastiques, les textiles ou encore les matériaux de construction. Ils peuvent être transportés par voie aérienne ou dans l'eau, l'exposition à l'homme se

faisant donc par ingestion de nourriture, de poussière, d'eau, par inhalation de particules aériennes ou encore par voie dermique. La transmission de la mère à l'enfant s'effectue par voie placentaire puis à l'allaitement. Ces produits sont transportés à l'échelle mondiale naturellement, ou par voie commerciale, menant à une exposition internationale.

Pour autant, à ce jour, si des perturbateurs endocriniens semblent en partie expliquer l'incidence de certaines maladies, le lien de cause à effet est encore flou. Seulement une part minime de ces produits a véritablement été étudiée pour leurs possibles conséquences sur la santé, par des expériences sur l'animal ou sur culture cellulaire. De même, peu d'études épidémiologiques cherchant un lien entre exposition à un perturbateur endocrinien et expression d'une maladie existent.

### **c/ Effets sur la reproduction**

De nombreux effets sur la reproduction ont été associés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens. Une grande proportion de jeunes hommes, exposés à différents perturbateurs endocriniens, semblent présenter une plus faible qualité du sperme<sup>2-4</sup>. Chez l'Homme et chez la souris, l'exposition in utero au bisphénol A est corrélée à une diminution de la sécrétion de testostérone et de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de INSL3 (*Insulin-like 3*, protéine produite par les gonades)<sup>5</sup>. L'augmentation de l'incidence de malformations génitales comme la cryptorchidie et l'hypospadias, des taux de prématurité et de petits poids de naissance, la diminution de la fécondité ont tous pu être mis en lien avec l'exposition à différents perturbateurs endocriniens<sup>6</sup>. Une association avec l'âge des ménarches des jeunes filles, de plus en plus précoces dans les pays développés, a été évoquée<sup>7</sup>. Des modèles animaux ont retrouvé une association entre anomalies de différenciation des caractères sexuels, reproduction et exposition aux perturbateurs endocriniens<sup>8,9</sup>.

#### **d/ Effets sur le métabolisme**

Des études sur le métabolome de souris exposées au bisphénol A ont révélé un impact important de l'exposition sur le métabolisme, dont le métabolisme énergétique et les fonctions cérébrales. Chez des souris mâles, exposées du huitième jour de gestation au seizième jour de lactation, à des doses de bisphénol A comprises entre 0.025 et 25 µg/kg/jour, ont été altérés les taux de glucose, de pyruvate, de certains acides aminés et de neurotransmetteurs (acide γ-aminobutyrique et glutamate) <sup>10</sup>.

MacKay s'est intéressé également au métabolisme de souris exposées in utero, puis pendant la lactation, à de faibles doses de bisphénol A. A l'âge adulte, les souris mâles exposées présentaient une tolérance au glucose diminuée. Les souris femelles exposées avaient un poids et une adiposité supérieurs aux contrôles, des taux de leptine plus élevés ainsi qu'une masculinisation de la distribution de récepteurs œstrogéniques  $\alpha$ , évoquant des anomalies de dimorphisme sexuel <sup>11</sup>. Chez l'adulte, l'exposition aux perturbateurs endocriniens a récemment été liée à l'obésité, aux maladies cardio-vasculaires, au diabète et au syndrome métabolique. Tout comme pour les cancers (figure 3), la rapidité d'augmentation de ces maladies sur les précédentes décennies semble exclure les causes génétiques à elles seules.

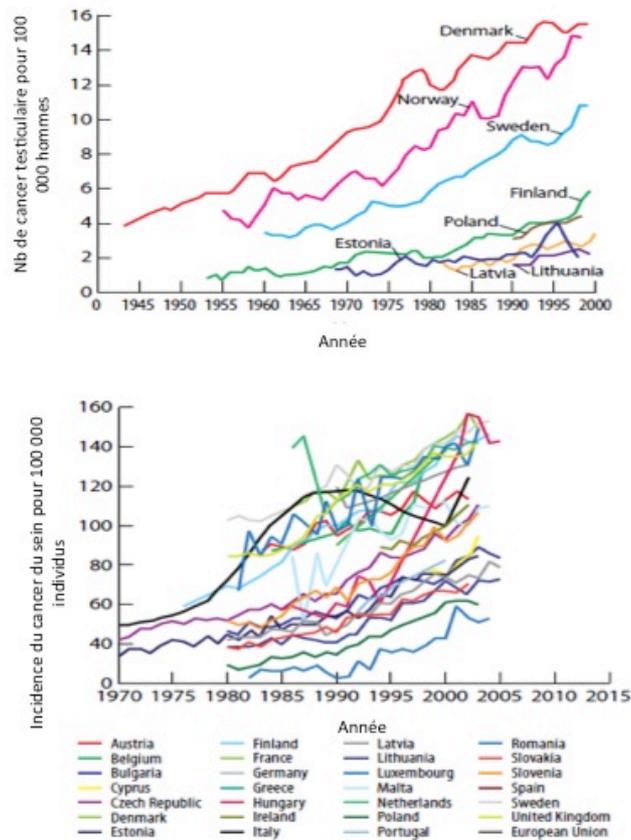


Figure 3. Incidence des cancers du testicule (A) et du sein (B) à travers l'Europe. Figure tirée du rapport de l'OMS de 2013 sur les perturbateurs endocriniens.

### e/ Effets sur l'immunité

Dans une revue récente de la littérature, Rogers et al. recensent les perturbations induites par l'exposition au bisphénol A sur le système immunitaire <sup>12</sup>. La plupart des lignées cellulaires actrices de l'immunité se retrouvent en effet altérées suite à l'exposition chronique au bisphénol A (figure 4).

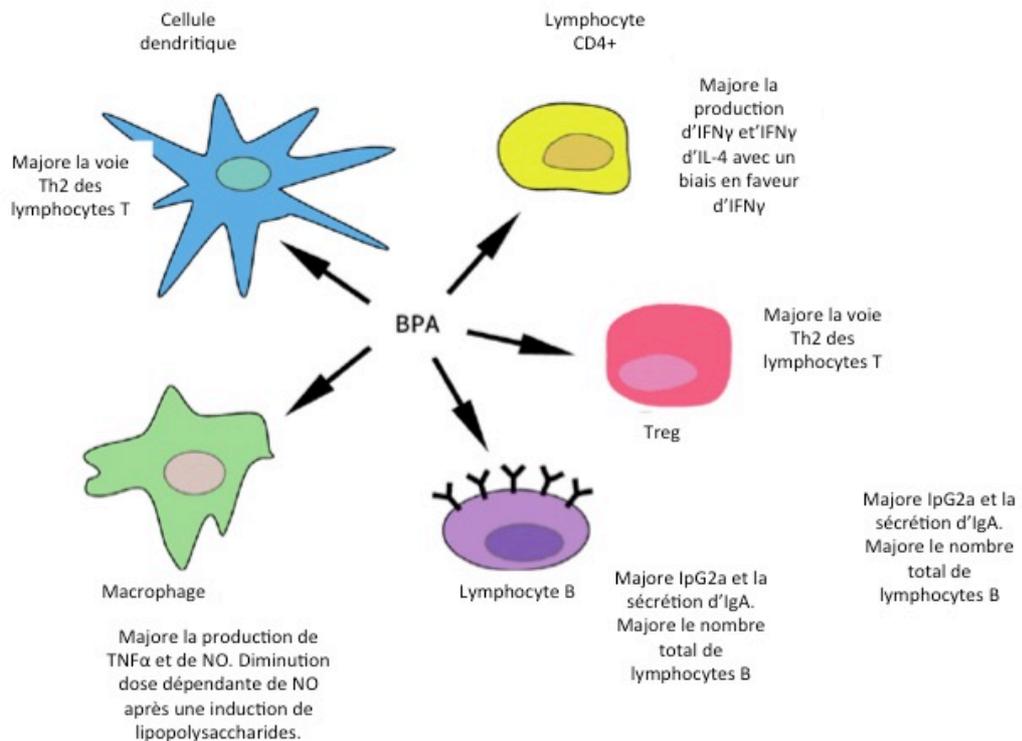


Figure 4. Le bisphénol A altère le phénotype de nombreuses cellules immunitaires.

Les mécanismes évoqués sont multiples. Ils peuvent s'expliquer par l'action sur les récepteurs aux œstrogènes. Les cellules immunitaires expriment en effet, dans leur majorité, des récepteurs aux œstrogènes<sup>13</sup>. Ainsi, les cellules CD4+ expriment en grand nombre les récepteurs  $\alpha$ <sup>14</sup>. Par ailleurs ces récepteurs médient par eux-mêmes la réponse immunitaire<sup>15</sup>. D'autres cibles de recherche actuelles regroupent les récepteurs arylhydrocarbone<sup>16</sup> et les PPAR (*peroxysome proliferator-activated receptor*)<sup>17</sup>.

## f/ Des fenêtres d'exposition critiques

Certaines « fenêtres » du développement paraissent critiques quant à l'exposition aux perturbateurs endocriniens, dont la période de développement fœtal et la période pu-

bertaire (figure 5). Chez l'adulte, l'exposition à une hormone ou à un perturbateur endocrinien se traduit par un effet immédiat, la disparition de l'exposition se traduira par une diminution de l'effet au préalable observé. Durant le développement et chez l'enfant en revanche, l'exposition aux perturbateurs endocriniens pourra se traduire par des effets permanents<sup>18</sup>, susceptibles d'apparaître de nombreuses années plus tard (figure 6). Ces mécanismes commencent à être compris (figure 7). Ainsi, il paraît clair aujourd'hui que les hormones participent à la différenciation tissulaire durant la phase embryonnaire et l'enfance. Plus tard, elles seront indispensables au maintien de l'homéostasie et à l'intégration des signaux entre tissus et organes. De ce fait, on comprend que l'exposition aux perturbateurs endocriniens durant les périodes précoces de la vie se traduira par des effets tissulaires souvent permanents.

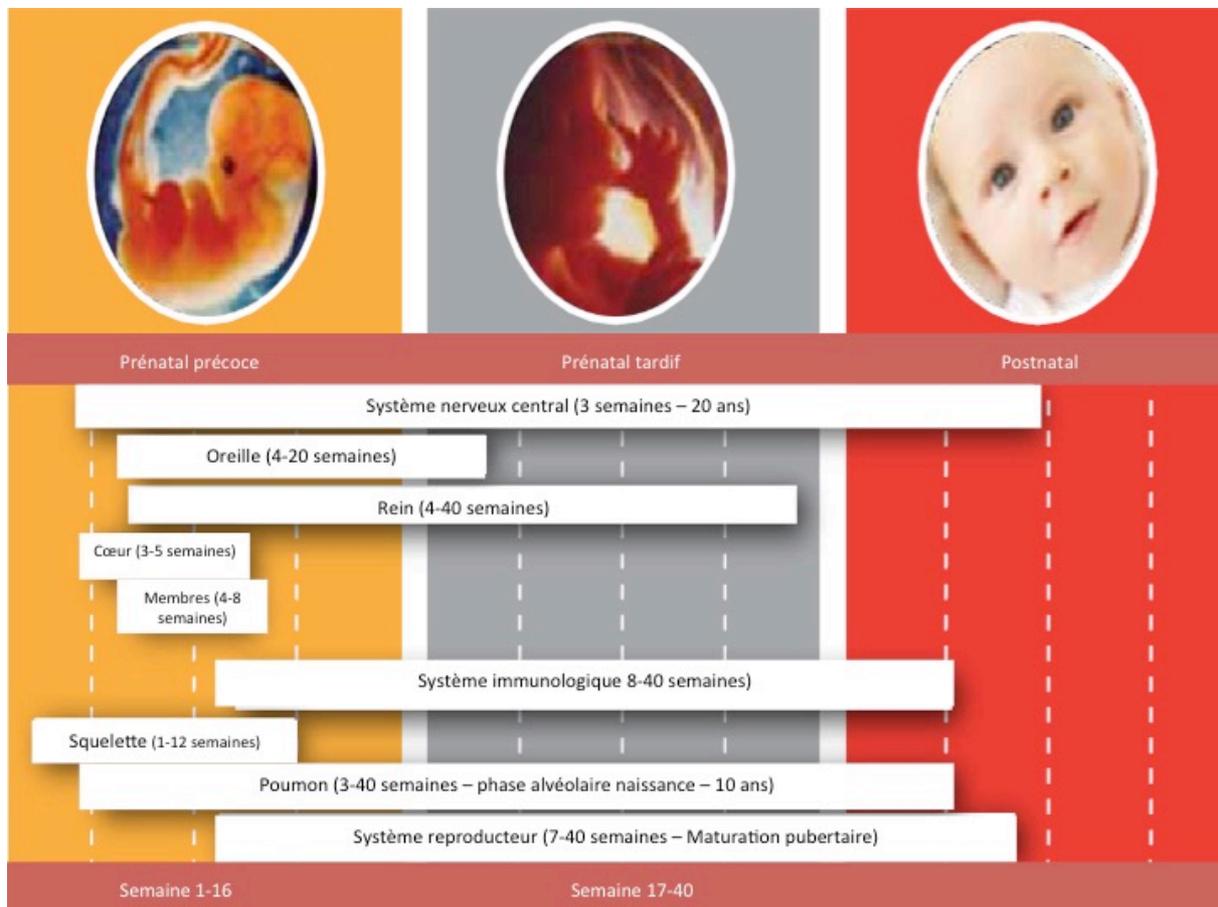


Figure 5. Fenêtres de sensibilité durant le développement. Chaque tissu possède une fenêtre spécifique durant son développement correspondant à sa formation. Certains tissus, qui continuent à se former après la naissance, ont ainsi des fenêtres de sensibilité aux perturbateurs endocriniens plus étendues. Schéma tiré du rapport de l'OMS de 2013 sur les perturbateurs endocriniens.

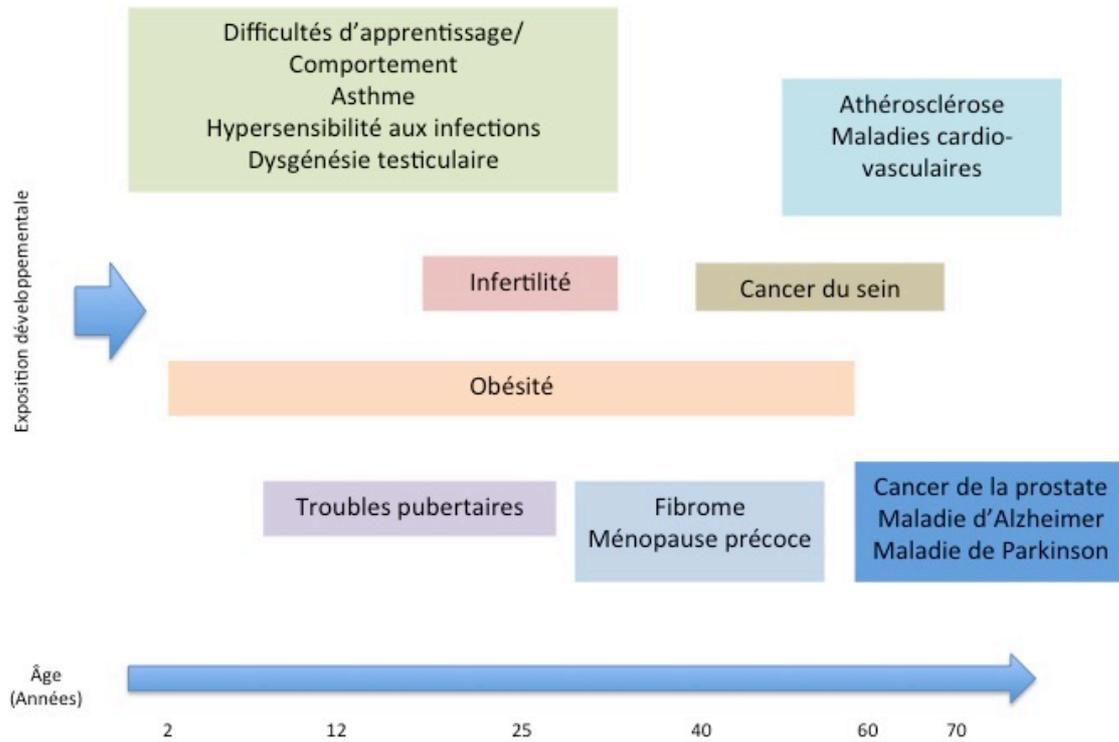


Figure 6. Exemples de maladies et de dysfonctions potentielles résultant d'une exposition précoce aux perturbateurs endocriniens.

Les conclusions du rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé et du Programme des Nations Unies pour le Développement de 2013 indiquent que le risque lié aux perturbateurs endocriniens est aujourd'hui toujours significativement sous-estimé.

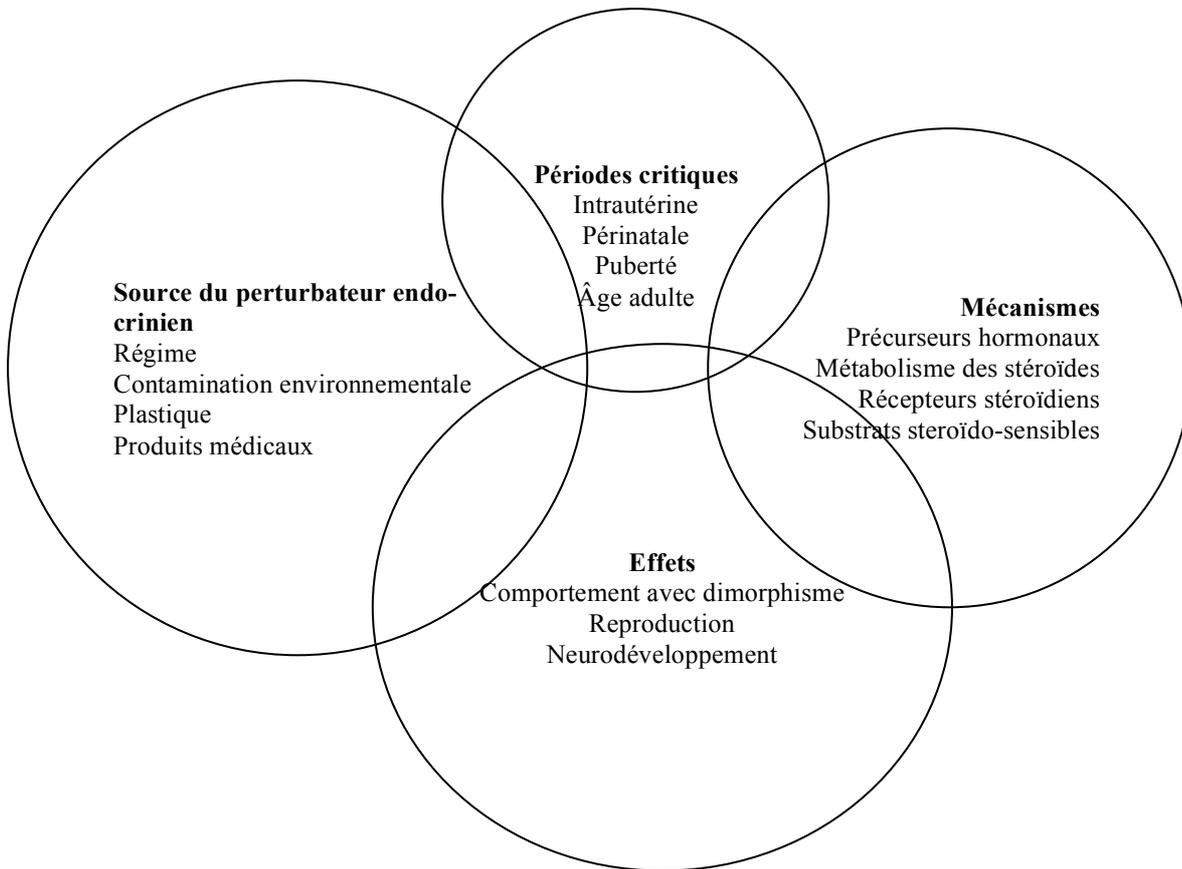


Figure 7. Représentation schématique des différentes sources de perturbateurs endocriniens, de leurs mécanismes et de leurs actions, durant des périodes critiques.

### 3. L'exemple du diethylstilbestrol (Distilbène®)

#### a/ Historique

Le diethylstilbestrol est un œstrogène non-stéroïdien se présentant sous forme de poudre inodore, soluble dans l'eau et dans de nombreux liquides. Il présente un isomère *trans*, stable dans l'environnement, et un isomère *cis*, instable, qui tend à se transformer spontanément en forme *trans*<sup>19</sup>. Il fut le premier œstrogène de synthèse produit en 1938, en Grande-Bretagne, par Edward Dodds. Il fut massivement prescrit du début des années 40 jusqu'en 1971, en première intention dans la prévention des fausses-couches et de la prématurité (figure 8). Il avait été en effet suggéré à l'époque, que les fausse-couches étaient précédées d'une baisse du taux d'œstrogènes. De ce fait, la prescription d'œstrogènes pouvait permettre d'en réduire le risque. Cette hypothèse fut testée dans les années 40 par Smith et Smith<sup>20,21</sup>. Dans une étude clinique en effet, un taux diminué de prééclampsie, d'accouchement prématuré et d'avortement spontané fut reporté. Néanmoins, l'étude n'était ni randomisée, ni menée en aveugle. Avec le recul, l'interprétation des résultats pouvait donc être difficile.

"Really?"



Yes...

**desPLEX**®

to prevent ABORTION, MISCARRIAGE and  
PREMATURE LABOR

recommended for routine prophylaxis  
in ALL pregnancies . . .

96 per cent live delivery with desPLEX  
in one series of 1200 patients<sup>4</sup>—  
— bigger and stronger babies, too.<sup>4,5</sup>

No gastric or other side effects with desPLEX  
— in either high or low dosage<sup>3,4,5</sup>

(Each desPLEX tablet starts with 25 mg. of diethylstilbestrol, U.S.P., which is then ultramicrotonized to smooth and accelerate absorption and activity. A portion of this ultramicrotonized diethylstilbestrol is even included in the tablet coating to assure prompt help in emergencies. desPLEX tablets also contain vitamin C and certain members of the vitamin B complex to aid detoxification in pregnancy and the effectuation of estrogen.)

For further data and a generous  
trial supply of desPLEX, write to:  
Medical Director

REFERENCES

1. Canerio, E. M., et al.: Am. J. Obst. & Gynec. 65:1298, 1952.
2. Gimant, L., and Kaplowitz, A.: N. Y. St. J. Med. 50:2823, 1950.
3. Karnaky, K. J.: South. M. J. 45:1166, 1952.
4. Peña, E. R.: Med. Times 82:921, 1954; Am. J. Surg. 87:95, 1954.
5. Ross, J. W.: J. Nat. M. A. 43:20, 1951; 43:223, 1952.

**GRANT CHEMICAL COMPANY, INC.**, Brooklyn 26, N.Y.

Figure 8. Publicité diffusée aux États-Unis pour le desPLEX ®, molécule à base de diethylstilbestrol.

Une étude menée en France par Lacassagne, en 1938, montrait déjà une augmentation de l'incidence de cancers mammaires chez la souris après administration de diethylstilbestrol<sup>22</sup>. C'est en se basant sur ces résultats que la *Federal Drug Administration* (FDA) américaine refusa, en 1940, la mise sur le marché du produit. En 1941, l'indication ne se portait que chez les femmes présentant une carence en œstrogènes et excluait les femmes enceintes. C'est en 1947 que la société américaine approuva l'utilisation du produit en prévention des avortements pour l'ensemble des grossesses.

La première étude à l'origine du débat sur l'indication du diethylstilbestrol fut celle de Dieckmann en 1953<sup>23</sup>. Dans un des premiers essais contrôlés de l'histoire, l'auteur conclut en l'absence significative entre les groupes exposés et contrôle, en terme d'avortements spontanés, de pré-éclampsie et de prématurité.

Plusieurs explications peuvent expliquer l'attrait du diethylstilbestrol pendant de nombreuses années, malgré la faiblesse du niveau de preuve scientifique autour de son efficacité. Il s'agit tout d'abord d'un produit facile à produire, et du fait de l'absence de brevet émis par Dodds, d'un faible coût. Plus de 200 laboratoires ont ainsi pu le produire dans le monde. En France, il fut commercialisé sous les noms de Distilbène® par le laboratoire UCB et Stilboestrol Borne® par le laboratoire Borne (qui deviendra Novartis). On estime que les conseils des leaders d'opinions d'époque, les efforts des laboratoires ainsi que la pression autour de l'utilité d'un traitement limitant les risques de fausses-couches ont tous prévalu sur l'analyse des travaux scientifiques de l'époque. En France, on estime que 200 000 grossesses furent exposées au Distilbène®, 160 000 naissances en auraient ainsi résulté. Aux Etats-Unis, on estime à environ 4 millions le nombre de grossesses exposées, soit 1,3% des grossesses entre 1947 et 1971<sup>24</sup>.

En 1971, la *Federal Drug Administration* américaine publia un bulletin prohibant la prescription de diethylstilbestrol aux femmes enceintes suite à la découverte de son association à l'adénocarcinome vaginal à cellules claires, notamment secondairement aux observations d'Herbst et al.<sup>25</sup>. Dans d'autres indications, sa prescription se poursuivit néanmoins dans les années 70, voire dans de plus rares cas au début des années 80. Ces indications comportaient des traitements hormono-substitutifs, le contrôle des cycles menstruels, la prévention de l'engorgement mammaire dans le post-partum, des thérapies palliatives dans le cancer du sein et de la prostate ainsi que dans la contraception du lendemain.

La réaction publique suite à la découverte des effets indésirables liées à l'exposition au diethylstilbestrol fut contrastée. En France notamment, certains estiment qu'afin d'éviter un affolement majeur, les informations furent parfois minimisées. Ceci pourrait expliquer notamment la poursuite de prescriptions après même l'interdiction américaine.

De nombreux aspects juridiques rentrent aujourd'hui encore en jeu. Aux Etats-Unis, plusieurs milliers d'actions juridiques ont eu lieu, elles ont, pour la plupart, abouties à des accords amiables. Les laboratoires furent estimés conjointement responsables à hauteur de leur parts de marché. Aux Pays-Bas, un fond d'indemnisation de 38 millions d'euros fut créé. En France, 70 procès environ sont en cours ou terminés. La responsabilité est dorénavant aux laboratoires de montrer que le produit n'est pas à l'origine du préjudice. A noter, qu'à ce jour, ni les prescripteurs, ni les autorités sanitaires, n'ont été mis en cause.

## **b/ Effets gynécologiques**

Une méta-analyse publiée en 2011 dans le *New England Journal of Medicine* par Hoover et al. rapporte les risques connus à ce jour, principalement gynécologiques, liés à l'exposition in utero au diethylstilbestrol <sup>26</sup>. Cette analyse regroupe 4653 femmes exposées au diethylstilbestrol, contre 1927 contrôles non exposés. Elle rassemble trois cohortes : l'étude DESAD (*Diethylstilbestrol Adenosis*), l'étude de Dieckmann, et la WHS (*Women Health Study*). Les résultats, en terme de *hazard ratios* et de risque cumulés, (à 45 ans pour la fertilité, 55 ans pour les autres effets) sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Effets indésirables	Femmes exposées	Femmes non-exposées	Hazard Ratio (IC 95%) †
	nb/nb total		
Infertilité	1144/3479	252/1654	2,37 (2,05 à 2,75)
Avortement spontané ‡	916/2690	328/1291	1,64 (1,42 à 1,88)
Grossesse ectopique ‡	255/2692	36/1293	3,72 (2,58 à 5,38)
Perte de grossesse au 2 <sup>ème</sup> trimestre ‡	201/2692	35/1293	3,77 (2,56 à 5,54)
Accouchement prématuré §	624/2385	100/1238	4,68 (3,74 à 5,86)
Pré-éclampsie §	216/2412	80/1159	1,42 (1,07 à 1,89)
Mort-né §	54/2385	16/1239	2,45 (1,33 à 4,54)
Mort néonatale §	57/2383	7/1238	8,12 (3,53 à 18,65)
Ménopause précoce	181/3993	49/1682	2,35 (1,67 à 3,31)
Néoplasie cervicale intra-épithéliale de grade > 2	208/4120	40/1785	2,28 (1,59 à 3,27)
Cancer du sein après 40 ans	61/3693	21/1647	1,82 (1,04 à 3,18)
Adénocarcinome à cellules claires	4/4652	0/1926	∞ (0,37 à ∞)

Tableau 3. Hazard Ratios pour les effets indésirables observés chez des femmes avec et sans exposition au diethylstilbestrol (DES) \*.

\* Le nombre total de femmes varie en fonction des effets étudiés, reflétant si l'ensemble des femmes, les gravides ou les pères étaient incluses dans l'analyse, mais également du à certaines réponses ou covariables manquantes en regard de l'effet étudié. CI dénote l'intervalle de confiance.

† Les *hazard ratios* ont été calculés avec l'âge comme facteur temps et ajustés sur la date de naissance et la cohorte.

‡ Les analyses ont été restreintes aux femmes gravides et ajustées sur le nombre de grossesses.

§ Les analyses ont été restreintes aux femmes pères et ajustées sur le nombre de naissances.

Effets indésirables	Femmes exposées	Risque cumulé †	Femmes non-exposées	Risque cumulé †	Excès de risque (IC 95%) ‡
	nb/nb total	pourcentage	nb/nb total	pourcentage	
Infertilité	1144/3769	33,3	252/1654	15,5	17,8 (14,5 à 20,9)
Avortement spontané §	916/2690	50,3	328/1291	38,6	11,7 (3,3 à 20,1)
Grossesse ectopique §	255/2692	14,6	36/1293	2,9	11,7 (8,9 à 14,5)
Perte de grossesse au second trimestre §	201/2692	16,4	35/1293	1,7	14,7 (8,5 à 20,9)
Accouchement prématuré ¶	590/2268	53,3	89/1140	17,8	35,4 (27,3 à 43,6)
Pré-éclampsie ¶	209/2299	26,4	77/1072	13,7	12,7 (4,5 à 20,9)
Mort né ¶	54/2385	8,9	16/1239	2,6	6,3 (-0,8 à 13,3)
Mort néonatal ¶	57/2383	7,8	7/1238	0,6	7,2 (1,9 à 12,5)
Ménopause précoce	181/3993	5,1	49/1682	1,7	3,4 (2,1 à 4,7)
Néoplasie cervicale intra-épithéliale grade > 2	208/4120	6,9	40/1785	3,4	3,5 (1,5 à 5,4)
Cancer du sein après 40 ans	59/3693	3,9	20/1647	2,2	1,7 (-1,4 à 4,7)

Tableau 4. Risques cumulés des effets désirables chez les femmes avec et sans exposition au diéthylstilbestrol et excès de risque du à l'exposition. \*

\* Le nombre total de femmes varie en fonction des effets étudiés, reflétant si l'ensemble des femmes, les gravides ou les pares étaient inclus dans l'analyse mais également du à certaines réponses ou covariables manquantes en regard de l'effet étudié. CI dénote l'intervalle de confiance.

† Les risques cumulés ont été calculés avec l'âge comme facteur temps et ajustés sur la date de naissance et la cohorte.

‡ L'excès de risque n'a pas été documenté pour les adénocarcinomes à cellules claires car il n'y avait pas de cas chez les femmes non exposées. Le risque cumulé pour les femmes exposées était de 0.1% (95% CI, 0.0 à 0.3).

§ Les analyses ont été restreintes aux femmes gravides et ajustées sur le nombre de grossesses.

¶ Les analyses ont été restreintes aux femmes pares et ajustées sur le nombre de naissances.

## **c/ Effets psychiatriques**

### ***c/1. Revue de la littérature***

Depuis le début des années 50, plusieurs études ont recherché une association entre exposition in utero au diethylstilbestrol et risque de maladies psychiatriques (figure 9).

La première étude rapportée remonte au début des années 50 au *London Hospital*, ses résultats furent publiés en 1983<sup>27</sup>. 813 primipares furent incluses dans cette étude contrôlée. Elles furent randomisées, en double aveugle, pour un traitement prophylactique par diethylstilbestrol, lors d'une première grossesse. Les résultats montrèrent une augmentation du risque de « maladies psychiatriques » chez les enfants exposés par rapport aux contrôles. La dépression et l'anxiété notamment étaient augmentées d'un facteur deux. Malgré l'absence de questionnaires standardisés, ces résultats furent considérés à l'époque comme surprenants, notamment du fait que l'étude s'était effectuée initialement en aveugle, tant pour les femmes exposées que pour les praticiens. Cet aspect limitait, en effet, un biais méthodologique qui handicaperait plus tard les études cherchant un lien entre exposition au diethylstilbestrol et augmentation du risque de maladies psychiatriques.

Cinq études sur des effectifs plus faibles ont proposé des passations de questionnaires semi-structurés (*Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia* ou *Diagnostic Interview Schedule*) reposant sur des critères plus standardisés<sup>28-31</sup>. Pour limiter le facteur psy-

chologique de stress du à l'exposition au diethylstilbestrol et à l'apparition d'effets secondaires de types urogénitaux notamment, trois de ces études<sup>29,31</sup> ont utilisé des contrôles atteints de maladies urogénitales d'intensité similaire. Dans ces trois études, des taux similaires d'épisode dépressif majeur furent retrouvés dans les deux groupes. Dans les deux études où les contrôles étaient de « simples » non exposés, le taux de dépression chez l'homme fut retrouvé supérieur. Dans toutes ces études, les taux de dépression retrouvés restaient supérieurs à ceux de la population générale. A noter que la puissance de ces cinq études reste faible du fait du petit nombre de patients inclus.

Deux analyses de larges cohortes ont été publiées<sup>32,33</sup>. La première, issue de la DESAD citée plus haut, retrouve un taux supérieur de perte pondérale liée à une anorexie mentale chez les femmes exposées in utero. Le diagnostic d'anorexie mentale reposant sur une perte de poids uniquement, il est difficile d'en tirer des conclusions psychopathologiques. Dans la seconde étude (3946 femmes exposées vs. 1740 contrôles, appariés sur l'âge), aucune différence de prévalence de maladies mentales entre les groupes n'a été retrouvée. Les auto-questionnaires comportant un nombre faible d'items, on ne peut exclure que des cas de dépressions ou d'anxiété aient pu être sous-évalués.

Deux études regroupent des sous-populations de cohorte de populations générales. Dans la première étude issue de l'*Etude Epidémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de L'Education Nationale*, 1352 mères ont complété un questionnaire sur 1680 enfants exposés versus 1447 frères et sœurs non-exposés. L'analyse de ces données ne rapporte aucune différence significative en termes de maladies psychiatriques entre les deux groupes.

En revanche, l'association entre exposition au diethylstilbestrol et dépression a été rapportée par l'étude de la cohorte de la *Nurse Health Study II*<sup>34</sup>. Cette cohorte, ayant débuté en 1989, comportait à l'époque 116 671 infirmières entre 25 et 42 ans, ayant rempli tous les deux ans un questionnaire sur leur état de santé. 1612 d'entre elles ont rapporté une exposition in utero au diethylstilbestrol. La présence d'un antécédent de dépression chez les patientes exposées fut retrouvée supérieure aux non-exposées (*Odds-Ratio* ajusté sur l'âge = 1.47, intervalle de confiance à 95% : 1.26-1.72,  $p < 0.001$ ). L'incidence des dépressions (estimée par le premier usage d'un antidépresseur chez des femmes rapportant également des symptômes dépressifs) durant le suivi de 1995 à 2005 fut rapportée par 19.7% des femmes exposées contre 15.9% des non exposées (*Odds-Ratio* ajusté sur l'âge = 1.41, intervalle de confiance à 95% = 1.22, 1.63,  $p < 0.001$ ).

Figure 9. Caractéristiques psychiatriques des patients exposés.

<b>Auteurs</b>	<b>Sujets exposés</b>	<b>Contrôles</b>	<b>Design de l'étude</b>	<b>Critère principal</b>	<b>Résultats principaux</b>
Vessey et al. 1983	126 hommes 145 femmes	138 hommes 1211 femmes	Questionnaire postal sur un échantillon de patients inclus dans un essai randomisé, en double-aveugle, sur le traitement prophylactique par DES d'une première grossesse, au début des années 50, au London Hospital.	Informations d'un médecin généraliste autour de pathologies psychiatriques	Prévalence de dépression et d'anxiété significativement supérieure dans le groupe DES en comparaison aux contrôles.
Ehrhardt et al. 1987	30 femmes	30 femmes avec frottis anormaux	Screening de patients exposés dans une clinique avec preuves documentées.	SADS-L/RDC	Prévalence d'épisode dépressif majeur similaire entre les groupes, dans les deux cas supérieure à celle de la population générale.
Fried-Cassoria et al. 1987	50 femmes	50 sœurs 50 femmes avec frottis anormaux		DIS/DSM III	Prévalence d'épisode dépressif majeur similaire entre les groupes DES et frottis anormaux, dans les deux cas supérieure à celle de leurs sœurs.
Meyer-Bahlburg and Ehrhardt 1987	15 hommes	19 hommes possiblement exposés 15 hommes avec problèmes urologiques mineurs	Sélection issue de données médicales d'un urologue à New York.	SADS-L/RDC	Prévalence d'épisode dépressif majeur similaire entre les groupes, dans les deux cas supérieure à celle de la population générale.
Meyer-Bahlburg and Ehrhardt 1985	17 hommes	17 hommes	Sélection issue de données d'un cabinet obstétrical dans le New Jersey	SADS-L/RDC	Prévalence d'épisode dépressif majeur supérieur dans le groupe DES.
Pillard et al. 1993	27 hommes	27 frères	Screening d'un échantillon clinique avec documentation d'une exposition prénatale à haute doses.	SADS-L/RDC	Prévalence d'épisode dépressif majeur supérieur dans le groupe DES. Pour les deux groupes, supérieure à celle de la population générale.
Gustavson et al. 1991	1711 femmes	919 femmes	Cohorte débutée en 1974 (DESAD), taux de réponse de 97%	Questionnaire	Prévalence supérieure d'antécédents de perte de poids.
Titus-Ernstoff et al. 2003	3946 femmes	1740 femmes	Combinaison de quatre cohortes (Dieckmann, DESAD, Home, Women's Health Studyyears), taux de réponse de 88%	Questionnaire	Pas de différence significatives entre les groupes (pathologie mentale, dépression, anxiété, psychose, anorexie/boulimie)
Verdoux et al. 2007	1680 individus de 1352 mères	1447 sujets	Sous-groupe issu d'une cohorte d'une population générale (E3N) de mères incluses pour facteurs de risques de cancers, autoquestionnaires avec taux de réponse 91%.	Questionnaire	Pas de différence significative entre les groupes (suicide, hospitalisation en psychiatrie, consultation avec un psychiatre ou psychologue).
O'Reilly et al. 2010	1612 femmes	74628 femmes	Sous-groupe issu de la cohorte 'Nurses' Health Study II	Questionnaire	Prévalence d'épisode dépressif majeur supérieur dans le groupe DES.

### ***c/2. Phénotypes proposés***

L'analyse de la littérature semble avancer un phénotype de dépression et/ou d'anxiété plus à risque d'être associé à l'exposition au diethylstilbestrol. Ces résultats ne suggèrent cependant pas une véritable spécificité de ce phénotype puisque toutes les catégories diagnostiques psychiatriques majeures sont rapportées chez les individus exposés<sup>27,35</sup>. A ce jour, les travaux de recherche en psychiatrie n'ont pas distingué, de façon évidente, des mécanismes physiopathologiques spécifiques aux différentes catégories diagnostiques. Certains travaux suggèrent même des chemins physiopathologiques communs à plusieurs catégories reposant notamment sur des bases génétiques<sup>36,37</sup>.

### ***c/3. Limites méthodologiques***

Plusieurs aspects méthodologiques rendent complexes l'interprétation des résultats d'associations entre exposition au diethylstilbestrol et risque de maladies psychiatriques. Nous avons vu qu'un facteur confondant majeur dans l'étude de l'exposition au diethylstilbestrol apparaît du fait que l'apparition de complications gynécologiques et obstétricales représente elles-mêmes un risque environnemental d'apparition de maladie psychiatrique.

Une autre difficulté est la prescription souvent concomitante à celle du diethylstilbestrol, d'éthinyl-œstradiol, lui-même perturbateur endocrinien œstrogénique.

Enfin, un biais de sélection apparaît de par le mode de recrutement des patients exposés. Un biais de sélection apparaît quand davantage de sujets exposés atteints que de sujets exposés sains sont inclus dans l'échantillon par comparaison à la population générale exposée. Par exemple, nous pourrions supposer que des patients cherchant une réparation juridique ou financière à un trouble pourraient être plus enclins à participer à une étude que des sujets exposés sains. Il a été reporté néanmoins que le modèle gène X environnement n'est pas su-

jet au biais de sélection en faisant l'assomption que le génotype n'influence pas les conditions de participation <sup>38</sup>.

#### ***c/4. Mécanismes sous-jacents***

A ce jour les mécanismes sous-tendant l'association entre exposition au diethylstilbestrol et émergence de troubles psychiatriques sont encore mal appréhendés. Deux mécanismes non-exclusifs peuvent être envisagés et seront revus en détail plus loin. Le premier pourrait être celui de variants génétiques dans les gènes de régulation épigénétique qui pourraient induire une vulnérabilité dans le maintien de la méthylation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) durant le neurodéveloppement. Nous savons, en effet, que l'exposition in utero aux hormones œstrogéniques peut altérer le profil de méthylation de l'ADN et notamment des promoteurs de gènes impliqués dans le neurodéveloppement (reelin, BDNF <sup>39,40</sup>). Le second mécanisme est lié directement aux effets œstrogéniques du diethylstilbestrol et à ses capacités de perturbation des systèmes endocriniens durant le neurodéveloppement.

#### **d/ Diethylstilbestrol et cancers**

Le diethylstilbestrol est aujourd'hui considéré comme un carcinogène humain. La plus forte preuve de carcinogenèse induite par le diethylstilbestrol vient d'études épidémiologiques in utero ayant corrélé fortement l'exposition in utero au diethylstilbestrol et l'apparition d'adénocarcinome à cellules claires, une variété rare de cancers cervico-vaginaux <sup>41</sup>. Ce sous-type de cancer, qui apparait habituellement chez des patientes âgées, émerge chez des femmes entre 10 et 30 ans exposées in utero au diethylstilbestrol. Chez l'homme, plusieurs études cas-témoins ont retrouvé une association entre exposition au diethylstilbestrol et cancers du testicule <sup>42</sup>. Le suivi de femme ayant pris du diethylstilbestrol durant leur grossesse a retrouvé une augmentation du risque de cancer du sein 15 à 20 ans plus tard, effet in-

firmé par d'autres études <sup>41,43</sup>. Enfin, comme pour les autres œstrogènes, la prise de diethylstilbestrol a été associée au risque de développer un cancer endométrial.

Les processus physiopathologiques sous-jacents sont multiples. Une étude sur des souris exposées au diethylstilbestrol en ontologie génétique a mis en évidence un défaut significatif des processus de réparation de l'ADN et de programmation apoptotique <sup>44</sup>.

## **e/ Effets divers**

Dans une étude récente, Rowas rapporte une altération de l'indice de masse osseuse avec un dimorphisme sexuel chez des souris exposées in utero au diethylstilbestrol <sup>45</sup>.

Sur le plan cardiaque une étude récente s'est intéressée aux effets cardiaques de l'exposition in utero au diethylstilbestrol chez la souris <sup>46</sup>. Après entraînement à la nage, les souris exposées présentaient une diminution significative de leur fonction systolique ainsi qu'une diminution de la relaxation diastolique. Au niveau moléculaire, et de façon intéressante, ces modifications cliniques coïncidaient avec une élévation de l'expression de la DNMT3a (*DNA MethylTransferase*) et à une augmentation de la méthylation de CpG contenus dans le promoteur du gène de la calcequestrine, protéine connue pour son implication dans la régulation des fonctions systoliques et diastoliques.

Yin s'est intéressé récemment au profil métabolique de souris exposées in utero au diethylstilbestrol. L'analyse néonatale du transcriptome de cellules épithéliales et mésenchymateuses de l'utérus a retrouvé une altération de l'expression de plus de 900 gènes, et notamment des gènes impliqués dans le système PPAR $\gamma$ , système régulateur, entre autres, du métabolisme lipidique. L'étude en microscopie électronique par transmission a retrouvé, en effet, des dépôts lipidiques importants dans l'utérus de souris exposées. Ces observations persistaient à l'âge adulte, confirmant les effets permanents de l'exposition in utero au diethylstilbestrol <sup>47</sup>.

Peu d'arguments existent à ce jour pour une association entre exposition au diethylstilbestrol et émergence de maladies auto-immunes <sup>48</sup>.

#### **4. Epigénétique et psychiatrie**

*Ce travail a fait l'objet d'une publication dans l'Encéphale, jointe ci-dessous.*

PSYCHIATRIE BIOLOGIQUE

## Hypothèse épigénétique de la schizophrénie : revue de la littérature

### *Epigenetics of schizophrenia: A review*

F. Rivollier<sup>a,b</sup>, L. Lotersztajn<sup>a,b</sup>, B. Chaumette<sup>a,b</sup>,  
M.-O. Krebs<sup>a,b</sup>, O. Kebir<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Service hospitalo-universitaire, centre hospitalier Sainte-Anne, 1, rue Cabanis, 75014 Paris, France

<sup>b</sup> Inserm U894, laboratoire « physiopathologie des maladies psychiatriques », université Paris Descartes, 2ter, rue d'Alésia, 75014 Paris, France

Reçu le 16 septembre 2013 ; accepté le 30 janvier 2014

#### MOTS CLÉS

Épigénétique ;  
Schizophrénie ;  
Facteurs de risque ;  
Gène x  
environnement ;  
Méthylation ADN

#### KEYWORDS

Epigenetics;  
Schizophrenia;  
Risk-factors;

**Résumé** La schizophrénie est une maladie complexe qui semblerait résulter d'interactions entre gène et environnement. Cet article présente l'état des connaissances actuelles sur le rôle des mécanismes épigénétiques dans la schizophrénie. L'épigénétique est l'étude des changements de l'expression génique, secondaires à des mécanismes transmis par la mitose, mais réversibles, sans qu'il n'y ait de modification de la séquence d'ADN génomique sous-jacente. Ces changements pourraient être secondaires à un facteur environnemental. Ils sont le résultat notamment de la méthylation de l'ADN (au niveau de gènes impliqués dans le neurodéveloppement ou dans les voies de neurotransmission glutamatergique et GABAergique) ou de la modification des histones (au niveau de la signalisation GABAergique). Se pose cependant le problème de biais de réalisation des études et d'une absence de généralisation des résultats, les processus sous-tendant cette interaction restant mal connus. Ces facteurs de régulation épigénétique peuvent eux-mêmes être le siège d'une vulnérabilité génétique fragilisant la régulation épigénétique, en interaction ou non avec des facteurs d'environnement à risque.

© L'Encéphale, Paris, 2014.

#### Summary

**Background.** – Schizophrenia is a frequent and disabling disease associated with heterogeneous psychiatric phenotypes. It emerges during childhood, adolescence or young adulthood and has dramatic consequences for the affected individuals, causing considerable familial and social burden, as well as increasing health expenses. Although some progress has been made in the

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [oussama.kebir@inserm.fr](mailto:oussama.kebir@inserm.fr) (O. Kebir).

Gene x environment;  
DNA methylation

understanding of their physiopathology, many questions remain unsolved, and the disease is still poorly understood. The prevailing hypothesis regarding psychotic disorders proposes that a combination of genetic and/or environmental factors, during critical periods of brain development increases the risk for these illnesses. Epigenetic regulations, such as DNA methylation, can mediate gene x environment interactions at the level of the genome and may provide a potential substrate to explain the variability in symptom severity and family heritability. Initially, epigenetics was used to design mitotic and meiotic changes in gene transcription that could not be attributed to genetic mutations. It referred later to changes in the epigenome not transmitted through the germline. Thus, epigenetics refers to a wide range of molecular mechanisms including DNA methylation of cytosine residues in CpG dinucleotides and post-translational histone modifications. These mechanisms alter the way the transcriptional factors bind the DNA, modulating its expression. Prenatal and postnatal environmental factors may affect these epigenetics factors, having responsibility in long-term DNA transcription, and influencing the development of psychiatric disorders.

*Object.* – The object of this review is to present the state of knowledge in epigenetics of schizophrenia, outlining the most recent findings in the matter.

*Methods.* – We did so using Pubmed, researching words such as 'epigenetics', 'epigenetic', 'schizophrenia', 'psychosis', 'psychiatric'. This review summarizes evidences mostly for two epigenetic mechanisms: DNA methylation and post-translational histone modifications.

*Results.* – First, in terms of epidemiology and transmission, the theoretical model of epigenetics applies to schizophrenia. Then, most environmental factors that have proved a link with this disease, may generate epigenetic mechanisms. Next, mutations have been found in regions implied in epigenetic mechanism among populations with schizophrenia. Some epigenetic alterations in DNA regions have been previously linked with neurodevelopmental abnormalities. In psychosis, some authors have found methylation differences in COMT gene, in reelin gene and in some genes implicated in dopaminergic, serotonergic, GABAergic and glutamatergic pathways. Histone modifications have been described, in particular the H3L4 histone methylation. Finally, we tried to underline the difficulties in epigenetic research, notably in psychiatry, and the limits in this matter.

*Conclusion.* – The epigenetic field may explain a lot of questions around the physiopathology of the complex psychiatric disease that is schizophrenia. It may be a substratum to the prevailing hypothesis of gene x environment interaction. The research in the matter is definitely expanding. It justifies easily the need to improve the effort in the domain to overpass some limits inherent to the matter.

© L'Encéphale, Paris, 2014.

## Introduction

La schizophrénie est une maladie complexe dont la compréhension physiopathologique reste très incomplète. Si son épidémiologie suggère la participation indéniable de facteurs génétiques, ceux-ci n'ont pu être précisément identifiés en dépit d'un effort de recherche important. En parallèle, des facteurs environnementaux paraissent également avoir un rôle dans l'apparition de la maladie. Un modèle actuel largement reconnu est celui d'une interaction gène x environnement, où une vulnérabilité génétique précipitée par un facteur environnemental révèle la maladie. Encore une fois, les processus sous-tendant cette interaction restent mal connus. La théorie épigénétique a été étudiée comme substratum moléculaire de ce mécanisme d'interaction gène x environnement notamment dans les pathologies psychiatriques [1]. Dans cette revue, nous présenterons un état synthétique des connaissances actuelles sur la théorie épigénétique de la schizophrénie.

## Interactions gènes x environnement dans la schizophrénie

La participation de facteurs génétiques dans l'apparition des troubles schizophréniques paraît aujourd'hui reconnue. Les études d'adoption montrent que le risque de troubles schizophréniques est le même chez des enfants nés de mères atteintes qu'ils soient élevés par leurs mères biologiques ou adoptives [2]. Ces données confirment que le risque de schizophrénie est transmis biologiquement plutôt que par le contexte familial d'adoption. Les recherches se sont alors orientées vers la détermination des bases génétiques de cette transmission.

Les études de liaison cherchent à identifier des régions polymorphiques du génome se transmettant avec la maladie dans les familles dont un membre au moins est atteint. Elles permettent ainsi de localiser un gène responsable sur un locus spécifique. Elles sont particulièrement puissantes pour les maladies monogéniques. Une vingtaine d'études dites

Pour citer cet article : Rivollier F, et al. Hypothèse épigénétique de la schizophrénie : revue de la littérature. Encéphale (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.encep.2014.06.005>

pangénomiques ont identifié des régions plus fréquemment retrouvées en liaison avec la schizophrénie (notamment les régions 1q, 2q, 3p, 4q, 6p, 8p, 11q, 13q, 14p, 20q et 22q) [3]. Néanmoins, dans l'hypothèse de plusieurs gènes chacun responsable d'effets minimes, un effectif extrêmement important est nécessaire pour obtenir des résultats significatifs, d'où la faiblesse de la plupart des études [4].

Par ailleurs, près de 800 gènes candidats pour la schizophrénie ont été testés à la recherche d'une association, mais aucun ne s'avère responsable de manière évidente à ce jour. Le manque de réplication de ces études pourrait s'expliquer par un manque de puissance statistique, des défauts d'analyse statistique, des analyses multiples faisant augmenter la probabilité des faux positifs et possiblement l'hétérogénéité génétique de la maladie. Enfin, si plusieurs études d'association pangénomique ont retrouvé de nombreux signaux répartis sur l'ensemble du génome, uniquement quelques-uns atteignent le niveau de signification très rigoureux requis pour ce genre d'études [5].

Des études récentes suggèrent le rôle de microdélétions ou de microduplications dans l'émergence de maladies neurodéveloppementales dont la schizophrénie. Ces polymorphismes appelés variations de nombre de copies (CNVs, *copy number variants*) seraient responsables des formes sporadiques, car apparus de novo, et non transmis par les parents. La fréquence des CNVs rares (souvent correspondant à moins de 1% des individus comme la délétion du 22q11) paraît augmentée chez les patients schizophrènes avec un risque relatif d'association à la maladie très important [6].

En outre, de nombreuses études ont étudié l'agrégation familiale de la schizophrénie dont le mode de transmission ne semble pas correspondre à un modèle mendélien monogénique. Le risque de développer une schizophrénie pour un apparenté de premier degré a été estimé à environ 10 fois le risque pour la population générale. Ce chiffre varie en fonction du lien de parenté. Ainsi, il est plus élevé chez les frères et sœurs (environ 10) ou chez les enfants (environ 13) d'un sujet atteint que chez ses parents (environ 6) [7]. Chez les parents au deuxième degré, ce risque est beaucoup plus faible (environ 3). Ainsi, ce risque diminue plus rapidement que le matériel génétique partagé, excluant un mode de transmission mendélien.

Les taux de concordance pour la schizophrénie chez les jumeaux monozygotes ont été estimés entre 40 et 50% alors que son héritabilité est évaluée autour de 80% [8]. Cette héritabilité estime l'origine de la variation de la maladie dans la population étudiée. Le risque de développer une schizophrénie apparaît le même chez la descendance de jumeaux monozygotes atteints et non atteints [9]. Les jumeaux non atteints seraient donc porteurs du risque génétique et héritable pour la schizophrénie sans l'exprimer, reflétant la part probable des facteurs environnementaux non partagés.

L'hypothèse génétique étant insuffisante pour rendre compte de l'apparition de la schizophrénie, de nombreux facteurs environnementaux ont été étudiés comme susceptibles de participer à l'apparition des troubles schizophréniques. Ont été identifiés ainsi des facteurs de risque comme les traumatismes dans l'enfance, le mode de vie urbain, l'appartenance à une minorité sociale, la consommation de cannabis [10]. D'autres facteurs, comme les

complications obstétricales ou encore la saisonnalité de naissance apparaissent comme associés au risque de schizophrénie. Cette augmentation de risque est souvent faible et les facteurs impliqués (à l'exception du cannabis) restent globaux et peu précis (exemple de l'urbanité). L'étude de ces facteurs environnementaux est rendue compliquée par la limitation de la répartition géographique de la population et par l'hétérogénéité dans les définitions de ces facteurs. Pour comprendre l'action de ces facteurs, plusieurs hypothèses ont pu être avancées. L'hypothèse neurodéveloppementale explique le rôle des complications obstétricales. Certains facteurs pourraient conduire à un stress biologique impliquant une modification dans la signalisation dopaminergique (migration, urbanité...). Ces facteurs sont susceptibles d'interagir eux-mêmes entre eux, conduisant à des interactions de type environnement x environnement : par exemple, les migrations sont plus fréquentes en zone urbaine.

Enfin, pour expliquer l'implication de facteurs précédemment cités, à la fois génétiques et environnementaux, les recherches actuelles tendent à penser que ces facteurs n'agiraient pas isolément mais en synergie, l'effet de l'un conditionnant l'autre. Le substratum de cette interaction demeure encore mal connu mais l'hypothèse épigénétique est intéressante pour expliquer les mécanismes de cette interaction.

### Définition de l'épigénétique et mécanismes en jeu

L'épigénétique est l'étude des changements de l'expression génique secondaires à des mécanismes transmis par la mitose mais réversibles, sans qu'il n'y ait de modification de la séquence d'ADN génomique sous-jacente [11]. Les mécanismes épigénétiques sont connus dans le développement et dans la différenciation cellulaire des organismes eucaryotes pluricellulaires. Ils assurent en effet la différenciation des cellules d'un même organisme en plusieurs types cellulaires différents, malgré le portage du même génome [12]. Les modifications épigénétiques peuvent également survenir plus tard dans la vie d'un organisme [13]. Ils peuvent ainsi apparaître après exposition à un facteur environnemental. Des souris soumises à un régime alimentaire particulier ont ainsi été affectées secondairement par des modifications épigénétiques conduisant à des changements phénotypiques (couleur du poil) et à l'apparition de susceptibilité à des maladies (cancer) [14]. Des mécanismes épigénétiques sont impliqués dans de nombreux processus développementaux associés à des modifications phénotypiques durables (empreinte génomique, inactivation du chromosome X). Ils sont également associés à plusieurs troubles neurodéveloppementaux comme le syndrome de Rett [15].

Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'expression des gènes. L'un d'eux se fait par le remodelage de la chromatine. La chromatine est le complexe formé par la séquence d'ADN s'enroulant autour des protéines histones. La conformation spatiale de la chromatine (état ouvert ou compact) est déterminante pour l'expression des gènes en regard. Il existe deux mécanismes épigénétiques de remodelage de la chromatine. Le plus étudié est celui de la méthylation

Pour citer cet article : Rivollier F, et al. Hypothèse épigénétique de la schizophrénie : revue de la littérature. Encéphale (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.encep.2014.06.005>

de l'ADN. Celle-ci a lieu sur des cytosines suivies de guanines (dits sites CpG), transformant la cytosine en 5-méthyl-cytosine. Cette méthylation est assurée notamment par trois enzymes appelées ADN méthyltransférases (DNMT) qui catalysent l'addition d'un groupe méthyl à un résidu cytosine. L'enzyme DNMT1 permet le maintien du profil de méthylation après la division cellulaire en assurant la méthylation du brin complémentaire. DNMT3a et DNMT3b ajoutent des nouvelles marques de méthylation sur l'ADN. Dans certaines régions du génome où les sites CpG sont abondants (formant des îlots), cette méthylation est corrélée négativement à l'expression génique. En effet, les cytosines méthylées recruteraient des protéines se liant à l'ADN telle que MECP2. Cette dernière recruterait à son tour des enzymes histones déacétylases (HDAC) qui compacteraient la structure de la chromatine, limitant l'accès à la transcription de l'ADN, et ainsi l'expression du gène correspondant. Ainsi, une hyperméthylation de l'ADN conduit à une diminution de l'expression des gènes adjacents alors que l'hypométhylation de l'ADN se traduit par une augmentation de leur expression. Le second mécanisme de remodelage de la chromatine s'effectue par des modifications post-transcriptionnelles des acides aminés formant les histones, notamment de leurs queues formées d'acides aminés (méthylation, acétylation...). En fonction d'un code—histone récemment déchiffré, la chromatine adopte un état compact ou ouvert.

L'environnement induirait des modifications épigénétiques, sans modification de la séquence ADN, qui conduiraient à des modifications de l'expression génique et donc à l'apparition de certaines maladies. Les processus par lesquels les facteurs environnementaux agissent au niveau moléculaire pour induire des modifications épigénétiques restent mal connus. De plus en plus de données suggèrent que les processus épigénétiques pourraient être influencés par des facteurs environnementaux tels que des facteurs nutritionnels, chimiques, physiques et même psychosociaux [16]. Au niveau des leucocytes périphériques, la méthylation de l'ADN paraît modifiée par des facteurs environnementaux comme le benzène, la pollution aérienne, l'arsenic, la cigarette, l'alcool, les perturbateurs endocriniens, l'activité physique et le régime diététique [17]. L'impact d'un facteur environnemental ponctuel pourrait donc ainsi avoir un effet à long terme du fait de la conservation post-mitotique des modifications épigénétiques. Si des périodes de sensibilité existent, telles que les périodes développementales clefs, véritables fenêtres de vulnérabilité, les phénomènes épigénétiques semblent également pouvoir se dérouler à l'âge adulte dans des neurones matures [18].

### Arguments pour la théorie épigénétique de la schizophrénie

Les bases biologiques du modèle gène x environnement actuellement utilisé pour rendre compte de l'apparition de maladies complexes, à transmission non mendélienne, font appel aux données de l'épigénétique. Plusieurs arguments existent en faveur de tels mécanismes dans ces pathologies et en particulier dans la schizophrénie.

Le dimorphisme sexuel dans la symptomatologie et dans l'évolution de la maladie psychotique pourrait être lié à un mécanisme épigénétique, les hormones sexuelles ayant une interaction connue avec ce mécanisme [19].

Le taux de concordance entre les jumeaux monozygotes pour la schizophrénie est estimé entre 40 et 50 %, soit largement inférieur à 100 % qui serait le taux attendu en cas de mécanisme génétique seul [9] ; cette discordance entre les jumeaux peut être mise en lien avec des différences entre signaux épigénétiques, ces derniers seuls étant susceptibles de se modifier au cours de la vie.

La notion de fenêtre de vulnérabilité, c'est-à-dire de périodes critiques pour les modifications épigénétiques est intéressante pour rendre compte du déclenchement de la schizophrénie qui est une pathologie émergente principalement à l'adolescence ou chez le jeune adulte.

Dans les années 1970, une étude menée sur des patients atteints de schizophrénie a trouvé une aggravation de leur niveau symptomatique après administration de L-méthionine (convertie en SAM, S-adenosyl-L-méthionine, dans l'organisme) [20]. Cette étude reposait sur l'hypothèse fautive que ce SAM accélérerait l'inactivation de la dopamine. L'homocystéine, résultant du catabolisme de la méthionine fait partie du métabolisme monocarboné qui génère les précurseurs des molécules impliquées dans la méthylation de l'ADN. Plusieurs études ont ainsi retrouvé des taux anormalement élevés d'homocystéine chez les sujets atteints de schizophrénie [21]. Des taux élevés d'homocystéine durant la grossesse semblent également représenter un facteur de risque pour la schizophrénie [22]. D'autres arguments existent en faveur de l'implication du métabolisme de l'homocystéine et plus généralement du métabolisme monocarboné dans la psychose [23]. MTHFR est une enzyme clef de ce métabolisme qui catalyse la production du 5-méthyltétrahydrofolate, un substrat pour la re-méthylation de l'homocystéine en méthionine. Une méta-analyse récente suggère une vulnérabilité génétique au niveau du gène codant pour MTHFR chez les patients atteints de schizophrénie, trouble bipolaire ou dépression unipolaire, vulnérabilité qui affecterait le métabolisme de l'homocystéine et par un effet global la régulation épigénétique [24]. Ainsi, la perturbation des mécanismes régulateurs de la méthylation de l'ADN serait liée à la schizophrénie, ce qui plaide pour l'argument épigénétique dans cette pathologie.

Enfin, plusieurs études moléculaires retrouvent des altérations d'expression des gènes codant pour les ADN méthyltransférases dans la schizophrénie. Ainsi, DNMT1 et DNMT3A pourraient être surexprimés dans le cortex préfrontal des sujets psychotiques [25,26]. D'autres enzymes catalysant les modifications post-traductionnelles des histones comme les histones déacétylases sont aussi dérégulées dans les régions préfrontales des sujets atteints [27]. Le taux de l'histone H3 méthylée 2 fois sur la lysine 9 (H3K9me2) est plus élevé dans le cortex pariétal des patients atteints de schizophrénie que dans celui des sujets témoins ; les taux des ARNm des histones méthyltransférases sont corrélés positivement à l'intensité des symptômes et à la durée de la maladie [28]. Il existe donc des arguments pour émettre l'hypothèse que la schizophrénie s'accompagne de dérégulation des systèmes impliqués dans les processus

Pour citer cet article : Rivollier F, et al. Hypothèse épigénétique de la schizophrénie : revue de la littérature. *Encéphale* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.encep.2014.06.005>

épigénétiques, qu'ils soient liés à la méthylation de l'ADN ou aux modifications des histones.

### Modifications épigénétiques rapportées dans les troubles psychotiques

Plusieurs études moléculaires se sont intéressées aux modifications épigénétiques liées aux troubles psychotiques, et ont mis en évidence des gènes dérégulés au niveau de voies biologiques connues pour participer à la physiopathologie de ces troubles.

Celles-ci ont ainsi mis en évidence des anomalies de méthylation des gènes codant notamment la *catechol-O-méthyltransferase domain-containing 1* (COMTD1) [29] et l'une des isoformes de la COMT, la *membrane-bound catechol-O-méthyltransferase* [30]. La COMT est une enzyme impliquée dans le catabolisme des neurotransmetteurs, notamment de neurotransmetteurs incriminés dans la schizophrénie comme la dopamine.

Des différences épigénétiques ont également été mises en évidence au niveau des gènes codant pour des récepteurs dopaminergiques : un patient schizophrène peut avoir un profil de méthylation du gène *DRD2* plus proche de celui d'autres patients schizophrènes que de son propre jumeau monozygote [31].

Des études réalisées sur du tissu cérébral post-mortem révèlent également des différences significatives dans les niveaux de méthylation de plusieurs gènes participant aux voies de neurotransmission glutamatergique et GABAergique, au niveau du cortex préfrontal, entre les sujets atteints de psychoses et les contrôles [32]. Chez les sujets atteints de psychoses, l'augmentation de l'expression de DNMT dans les neurones GABAergiques pourrait conduire à une hyperméthylation des promoteurs des gènes des transporteurs du GABA et de GAD 67, enzyme qui catalyse la formation de GABA à partir du glutamate [33]. La neurotransmission GABA est connue pour être altérée au niveau du cortex préfrontal des sujets atteints de schizophrénie [34].

Des anomalies de méthylation du gène *RELN* codant la reelin ont été retrouvées ; l'hyperméthylation du promoteur de ce gène par la DNMT1 conduirait à une diminution de la reelin dans les échantillons post-mortem de cortex préfrontal de sujets atteints de psychoses [35]. Cette glycoprotéine est connue pour permettre le guidage des neurones et des cellules gliales au cours du développement. Une diminution de son expression a été retrouvée dans le cortex préfrontal des sujets atteints de schizophrénie [34]. La dérégulation épigénétique des voies du neurodéveloppement est également retrouvée dans l'étude de Mill et al. [32] avec l'implication du BDNF. Par ailleurs, une étude comparative de l'épigénome de paires de jumeaux monozygotes discordants pour la schizophrénie ou le trouble bipolaire a retrouvé plusieurs loci ayant une méthylation différentielle au niveau des leucocytes périphériques. Ces loci paraissent impliqués dans des réseaux biologiques du neurodéveloppement ; la région présentant une méthylation différentielle la plus significative étant localisée dans le promoteur du gène codant pour l'alpha *n*-acétyl galactosamide alpha-2,6-sialyltransférase 1 (ST6GALNAC1), une protéine importante pour les interactions intercellulaires [36]. Ces dysrégulations épigénétiques

des gènes impliqués dans les voies du développement cérébral accréditent la thèse neurodéveloppementale de la schizophrénie.

Les voies biologiques de la sérotonine pourraient également être impliquées avec, chez les patients ayant présenté un premier épisode de schizophrénie, des différences de méthylation du promoteur du gène *HTR1E* (récepteur sérotoninergique) [28]. Enfin, chez les sujets atteints de trouble bipolaire ou de schizophrénie, il a été observé une augmentation de la méthylation du promoteur de la région du gène *5HTR1* et du gène *5HTR2A*, pouvant expliquer la diminution de l'expression de ces récepteurs chez ces populations, récepteurs eux-mêmes ciblés dans le traitement de ces maladies [37].

Des modèles animaux ont également permis de modéliser les conséquences de la dérégulation épigénétique de certains gènes. Ainsi, une étude basée sur un modèle murin montre que le stress prénatal induit des anomalies dans la régulation de la méthylation de l'ADN associant un niveau accru de l'ADN méthyltransférase et une hyperméthylation des promoteurs des gènes codant pour les protéines reelin et *GAD67*, corrélés à des comportements modélisant la schizophrénie (hyperactivité, déficit d'interaction sociale, conditionnement à la peur) [38]. Dans une autre expérience menée chez des souris [39], l'isolement durant la période critique de l'adolescence conduit à des anomalies comportementales et à une libération accrue de dopamine en lien avec une hyperméthylation du gène de la tyrosine-hydroxylase (enzyme catalysant la synthèse de L-DOPA, précurseur de la dopamine), uniquement dans le groupe où le facteur environnemental de stress est combiné à un facteur génétique impliqué dans des pathologies neuropsychiatriques (soit uniquement dans le groupe de souris déficientes pour *DISC1*, *disrupted in schizophrenia 1*).

Les études portant sur les modifications des histones sont pour le moment peu nombreuses mais restent prometteuses. L'une d'elles suggère par exemple que des modifications de la méthylation de l'histone H3-lysine 4 conduiraient à un remodelage de la chromatine au niveau du promoteur du gène *GAD1* et donc à une modification de l'expression de ce gène impliqué dans la synthèse du GABA [40]. Si les données de la littérature en matière d'épigénétique de la schizophrénie permettent une meilleure appréhension de la maladie, elles pourraient également améliorer la connaissance des mécanismes d'action des psychotropes et favoriser le développement de nouveaux agents pharmacologiques. Un lien a été rapporté entre antidépresseurs et mécanismes épigénétiques ayant pour résultat la modification de l'expression de BDNF (facteur neurotrophique) dont la production est réprimée par le stress et stimulée par les antidépresseurs. Le valproate de sodium, ayant une activité inhibitrice des histones déacétylases, entraîne une déméthylation des cytosines de l'ADN et modifie le remodelage de la chromatine, permettant ainsi de corriger l'expression perturbée du système GABAergique. Son association aux antipsychotiques permettrait sur un plan théorique de potentialiser leur efficacité [41]. Une étude a montré que l'administration de méthionine chez les souris entraînait une diminution significative de l'expression de la reelin associée à une hyperméthylation du promoteur de ce gène, à des modifications des histones et à un phénotype comportemental de type *prepulse inhibition* ; l'administration de valproate, produit responsable

d'une déméthylation, a permis de corriger ces modifications épigénétiques et comportementales [42].

### Limites méthodologiques des études épigénétiques en psychiatrie

Les études citées précédemment soulèvent l'importance de la régulation épigénétique dans la maladie. Elles sont cependant confrontées à de nombreux biais méthodologiques limitant la généralisation des résultats. Elles portent sur des échantillons post-mortem du système nerveux central de qualité variable (la conservation des tissus est sensible au délai entre décès et expérimentation) et dont l'interprétation des résultats est biaisée par les facteurs âge, traitements psychotropes reçus, chronicité des troubles, tabagisme et autres facteurs pouvant potentiellement modifier la méthylation de l'ADN. Les études réalisées sur des échantillons sanguins posent de leur côté la question des possibilités d'interprétation des résultats, les neurones faisant partie des cellules les plus différenciées de l'organisme.

Les échantillons sont obtenus à partir de patients présentant une psychose caractérisée ce qui regroupe, selon les études, patients schizophrènes et patients bipolaires avec éléments psychotiques ; cette variabilité clinique peut permettre de déterminer des susceptibilités biologiques communes entre ces pathologies proches et parfois difficilement distinguables au niveau clinique mais peut également être un facteur confondant. Très peu d'études se sont intéressées à mettre en évidence des différences significatives entre ces deux pathologies ; une étude post-mortem [43] a pourtant révélé de telles différences au niveau de l'expression de DNMT1 au sein des neurones GABAergiques des ganglions de la base, les patients schizophrènes ayant une surexpression de cette protéine régulatrice de la méthylation, contrairement aux patients bipolaires. Les études devraient donc être particulièrement rigoureuses sur la caractérisation phénotypique des sujets inclus, certains gènes pouvant être modifiés sur le plan épigénétique quelle que soit la pathologie psychiatrique mais d'autres étant plus spécifiques de la symptomatologie présentée.

Enfin, la majorité des études se sont focalisées sur des régions promotrices des principaux gènes candidats sélectionnés par des études antérieures d'association génétique. Cependant, les régions importantes pour la régulation épigénétique pourraient être indépendantes des régions contenant des polymorphismes génétiques associés à la maladie. Accéder à des échantillons de tissu cérébral de bonne qualité et provenant de patients ayant eu une bonne caractérisation phénotypique est le défi actuel des chercheurs en épigénétique psychiatrique. Par ailleurs, l'étude de la dérégulation épigénétique des psychoses ne permet pas d'affirmer le caractère causal ou induit des modifications observées.

### Conclusion

Les études présentées dans cet article plaident pour une implication des facteurs épigénétiques dans les troubles psychotiques à plusieurs niveaux. Ils interviendraient en tant que « médiateur » de l'action d'un environnement à

risque sur l'expression génétique. Les facteurs de régulation épigénétique eux-mêmes peuvent être le siège d'une vulnérabilité génétique, fragilisant la régulation épigénétique, en interaction ou non, avec des facteurs d'environnement à risque. Isoler la contribution des facteurs épigénétiques dans l'étiopathogénie de la schizophrénie n'est pas aisée. Bien que les études cas témoins décrivent de plus en plus l'existence d'anomalies épigénétiques, bien que les études épidémiologiques apportent des arguments indéniables, bien que les études animales permettent de mieux approcher le phénomène sans être directement transposables, l'évidence directe et répliquée du rôle joué par la régulation épigénétique comme interface entre les facteurs d'environnement et la physiopathologie des psychoses n'est pas disponible. Les données sont plutôt rares et de nature préliminaire nécessitant une confirmation. Combiner les données épidémiologiques, les analyses moléculaires de cohortes prospectives pouvant fournir un tissu exploitable et la modélisation animale des effets de l'exposition à des facteurs d'environnement à risque contrôlables en laboratoire permettra certainement de mieux connaître l'implication de la régulation épigénétique dans la physiologie du système nerveux central et dans l'émergence des psychoses. Enfin, le développement de molécules capable de modifier l'épigénome des patients [44] serait susceptible de fournir de nouveaux outils thérapeutiques et de modifier l'évolution de ces pathologies chroniques et lourdement handicapantes.

### Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

### Références

- [1] Azorin JM, Kaladjian A, Fakra E, et al. [Gene-environment interactions in affective disorders]. *Encéphale* 2010;36(Suppl. 6):S167-72.
- [2] Higgins J. Effects of child rearing by schizophrenic mothers: a follow-up. *J Psychiatr Res* 1976;13(1):1-9.
- [3] Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, et al. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2009;14(8):774-85.
- [4] Crow TJ. How and why genetic linkage has not solved the problem of psychosis: review and hypothesis. *Am J Psychiatry* 2007;164(1):13-21.
- [5] Sanders AR, Duan J, Levinson DF, et al. No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics. *Am J Psychiatry* 2008;165(4):497-506.
- [6] Rees E, Moskvina V, Owen MJ, et al. De novo rates and selection of schizophrenia-associated copy number variants. *Biol Psychiatry* 2011;70(12):1109-14.
- [7] Gottesman I, Shields J. Schizophrenia, the epigenetic puzzle. New York: Cambridge University Press; 1982.
- [8] Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60(12):1187-92.
- [9] Kringlen E, Cramer G. Offspring of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1989;46(10):873-7.
- [10] Van Os J, Kenis G, Rutten BPF. The environment and schizophrenia. *Nature* 2010;468(7321):203-12.

Pour citer cet article : Rivollier F, et al. Hypothèse épigénétique de la schizophrénie : revue de la littérature. *Encéphale* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.encep.2014.06.005>

- [11] Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet* 1997;13(8):293–5.
- [12] Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3(9):662–73.
- [13] Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007;8(4):253–62.
- [14] Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 2002;132(Suppl. 8):2393S–400S.
- [15] Kavalali ET, Nelson ED, Monteggia LM. Role of MeCP2 DNA methylation, and HDACs in regulating synapse function. *J Neurodev Disord* 2011;3(3):250–6.
- [16] Suderman M, McGowan PO, Sasaki A, et al. Conserved epigenetic sensitivity to early life experience in the rat and human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(Suppl. 2):17266–72.
- [17] Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, et al. DNA methylation in white blood cells. *Epigenetics* 2011;6(7):828–37.
- [18] Rutten BP, Mill J. Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophr Bull* 2009;35(6):1045–56.
- [19] Pidsley R, Mill J. Epigenetic studies of psychosis: current findings, methodological approaches, and implications for postmortem research. *Biol Psychiatry* 2011;69(2):146–56.
- [20] Cohen SM, Nichols A, Wyatt R, et al. The administration of methionine to chronic schizophrenic patients: a review of ten studies. *Biol Psychiatry* 1974;8(2):209–25.
- [21] Bouaziz N, Ayedi I, Sidhom O, et al. Plasma homocysteine in schizophrenia: determinants and clinical correlations in Tunisian patients free from antipsychotics. *Psychiatry Res* 2010;179(1):24–9.
- [22] Brown AS, Bottiglieri T, Schaefer CA, et al. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64(1):31–9.
- [23] Krebs MO, Bellon A, Mainguy G, et al. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Mol Med* 2009;15(12):562–70.
- [24] Peerbooms OL, van Os J, Drukker M, et al. Meta-analysis of MTHFR gene variants in schizophrenia, bipolar disorder and unipolar depressive disorder: evidence for a common genetic vulnerability? *Brain Behav Immun* 2010;25(8):1530–43.
- [25] Veldic M, Guidotti A, Maloku E, et al. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(6):2152–7.
- [26] Zhubi A, Veldic M, Puri NV, et al. An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. *Schizophr Res* 2009;111(1–3):115–22.
- [27] Gavin DP, Kartan S, Chase K, et al. Reduced baseline acetylated histone 3 levels and a blunted response to HDAC inhibition in lymphocyte cultures from schizophrenia subjects. *Schizophr Res* 2008;103(1–3):330–2.
- [28] Chase KA, Gavin DP, Guidotti A, et al. Histone methylation at H3K9: evidence for a restrictive epigenome in schizophrenia. *Schizophr Res* 2013;149(1–3):15–20.
- [29] Nishioka M, Bundo M, Koike S, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *J Hum Genet* 2013;58(2):91–7.
- [30] Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, et al. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2006;15(21):3132–45.
- [31] Petronis A, Gottesman II, Kan P, et al. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull* 2003;29(1):169–78.
- [32] Mill J, Tang T, Kaminsky Z, et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet* 2008;82(3):696–711.
- [33] Grayson DR. Schizophrenia and the epigenetic hypothesis. *Epigenomics* 2010;2(3):341–4.
- [34] Guidotti A, Auta J, Davis JM, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57(11):1061–9.
- [35] Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, et al. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *PNAS* 2004;101(1):348–53.
- [36] Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, et al. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2011;20(24):4786–96.
- [37] Carrard A, Salzmann A, Malafosse A, et al. Increased DNA methylation status of the serotonin receptor 5HT1A gene promoter in schizophrenia and bipolar disorder. *J Affect Disord* 2011;132(3):450–3.
- [38] Matriciano F, Atueting P, Dala I, et al. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia like phenotype induced by prenatal stress. *Neuropharmacology* 2013;68:184–94.
- [39] Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, et al. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science* 2013;339(6117):335–9.
- [40] Huang HS, Matevosian A, Whittle C. Prefrontal dysfunction in schizophrenia involves mixed-lineage leukemia 1-regulated histone methylation at GABAergic gene promoters. *J Neurosci* 2007;27(42):11254–62.
- [41] Guidotti A, Dong E, Kundakovic M. Characterization of the action of antipsychotic subtypes on valproate-induced chromatin remodeling. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30(2):55–60.
- [42] Tremolizzo L. Epigenetic model in the pharmacologic modulation of vulnerability to schizophrenia. *Encéphale* 2007;33:867–9.
- [43] Veldic M, Kadriu B, Maloku E, et al. Epigenetic mechanisms expressed in basal ganglia GABAergic neurons differentiate schizophrenia from bipolar disorder schizophrenia research. *Schizophr Res* 2007;91(1–3):51–61.
- [44] Peedicayil J. Epigenetic management of major psychosis. *Clin Epigenet* 2011;2:249–56.

## **5. Objectifs de l'étude**

En s'appuyant sur l'exemple du diethylstilbestrol, dont l'exposition est identifiable et non ubiquitaire, nous avons souhaité mener une étude clinique, afin de mieux comprendre les conséquences liées à son exposition sur le neurodéveloppement. Pour cela, nous avons comparé des sujets exposés in utero à des sujets sains, sur des critères cliniques d'une part, et sur des marqueurs de méthylation des cellules de la lignée leucocytaire périphériques d'autre part.

# **MATÉRIELS & MÉTHODES**

## **1. Recrutement**

### **A/ Principes du recrutement**

Le recrutement a été conduit au « Centre d'évaluation et de recherche clinique » (CERC) au Service Hospitalo-Universitaire de l'Hôpital Sainte-Anne. Elle intègre le programme de recherche « PSYDEV » (promu par l'INSERM) ayant obtenu toutes les autorisations nécessaires. Chaque participant a reçu une information sur l'étude et a signé un formulaire de consentement.

244 patients, issus de 71 familles, ont été inclus dans l'étude clinique initiale. Ces familles comportent le probant, un ou deux parents, ainsi que la fratrie éventuelle.

Parmi l'ensemble de ces patients nous avons choisi d'étudier tout particulièrement, sur le plan clinique et génétique, des fratries discordantes d'individus exposés ou non-exposés, pour lesquels l'exposition était le mieux renseignée possible.

Nous avons ainsi inclus 75 frères et sœurs caucasiens issus de 31 familles dont au moins un membre a été exposé en prénatal à une hormone œstrogénique (diethylstilbestrol et/ou ethynil-estradiol). 41 ont été exposés, 34 non-exposés.

## **B/ L'association Hhorages**

Le recrutement de nos patients a été effectué grâce à l'association Hhorages (Halte aux HORmones Artificielles pendant les Grossesses). Cette association a été fondée en décembre 2001 par cinq mères s'étant elles-mêmes vu prescrire des hormones artificielles pendant leurs grossesses. L'association cherche à établir un lien entre le risque de maladies psychiatriques apparaissant à l'adolescence et l'imprégnation in utero aux œstrogènes artificiels. Pour cela, l'association a récolté les témoignages écrit et oraux de plus de 1000 familles. L'association nous a permis de rentrer en contact avec 248 patients, tous revus en face à face, afin de récolter l'ensemble des données cliniques et d'anamnèse nécessaires à l'étude.

Du fait de la nature même de l'association, qui cherche donc à établir un lien entre exposition aux perturbateurs endocriniens et émergence de maladies psychiatriques, notre étude s'expose à un biais de recrutement évident. On peut en effet penser qu'il y aura plus de patients exposés et malades dans notre échantillon que de patients exposés et non malades dans la population générale. Afin de minimiser ce biais nous ne chercherons pas ici à comparer nos patients exposés à la population générale non exposée mais à leurs propres frères et sœurs non-exposés, recrutés par la même association.

## **2. Phénotypage**

Pour chaque patient et son entourage ont été recueillies des données cliniques sous formes de questionnaires formalisés :

- *The Pedigree and the Familial Interview for Genetic Studies (FIGS)*. Il s'agit d'un questionnaire standardisé, basé sur les critères diagnostiques du DSM-IV

(*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), permettant la collecte d'informations sur un probant par un ou plus membres de sa famille.

- Des éléments démographiques.
- L'histoire obstétricale, les médicaments reçus pendant la grossesse, les incidents pré et postnataux.
- Les antécédents médicaux : traitements, abus de substances, malformations urogénitales.
- Les données du développement : Echelle de signes neurologiques mineurs (Krebs et al. 2000) qui est un examen neurologique standardisé étudiant cinq domaines fonctionnels (coordination motrice, fonction intégratrice motrice, intégration sensorielle, mouvements involontaires ou posture et qualité de la latéralisation) ; les anomalies physiques mineurs (*The modified Waldrop scale* ; Gourion et al. 2001) ; le dépistage des troubles du développement (DTD).
- Les données psychiatriques :
  - o Les diagnostics ont été établis en utilisant la *Diagnostic Interview for Genetic Studies* (DIGS).
  - o Les symptômes ont été établis par des échelles semi-quantitatives : *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS), *the Positive and Negative Symptoms Scale* (PANSS, Kay et al. 1987), *the Montgomery and Asberg Depression Rating Scale* (MADRS, Montgomery and Asberg 1979), *Global Assessment of Functioning* (GAF, Luborsky et al. 1962).
- Des aspects cliniques subsyndromiques par des échelles d'auto-évaluation : *the Schizotypal Personality Questionnaire* (SPQ) (Raine et al, 1991, version française : Dumas et al, 1999), *the Peter's delusion inventory – 21 items* : (Peters et Garety, 1996 ; version française : Verdoux et al, 1998), and *the TEMPS A evaluating temperaments* (Akiskal, 2005 ; version française : Krebs et al. 2006)

### 3. Profil de méthylation

Ce travail a fait l'objet d'un Master 2. En s'appuyant sur l'exemple de l'exposition prénatale au diethylstilbestrol, l'objectif du Master se voulait :

- d'étudier la signature méthylomique de l'exposition in utero au diethylstilbestrol,
- d'identifier des régions de méthylation différentielles impliquées dans le neurodéveloppement et donc pouvant induire des anomalies neurodéveloppementales et une vulnérabilité aux maladies psychiatriques.

Pour chaque patient, nous avons étudié le profil de méthylation de plus de 450 000 CpG répartis sur le génome entier, en utilisant la technologie *HumanMethylation450 DNA Analysis BeadChip*®.

La puce de méthylation a été réalisée par le prestataire IntegraGen (Evry) sur de l'ADN extrait de leucocytes périphériques après prélèvements sanguins, congelés dans l'heure, conservés à -80°C.

#### a/ Réalisation de la puce de méthylation

Nous avons utilisé l'*Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit*. Celui-ci permet d'étudier 485 577 sites de méthylation par échantillon avec une résolution au nucléotide près. Son contenu couvre plus de 99% des gènes RefSeq avec une moyenne de 17 CpG par gènes, distribués au niveau du promoteur, de la région 5'UTR, du premier exon, du corps génique et

de la région 3'UTR. Il couvre également 96% des îlots CpGs et les régions les entourant.

### ***a/1. Traitement au bisulfite***

L'application de bisulfite à 1µg d'ADN, a permis la conversion de cytosine non méthylées en uracile (figure 10). Les cytosines méthylées restent des cytosines.

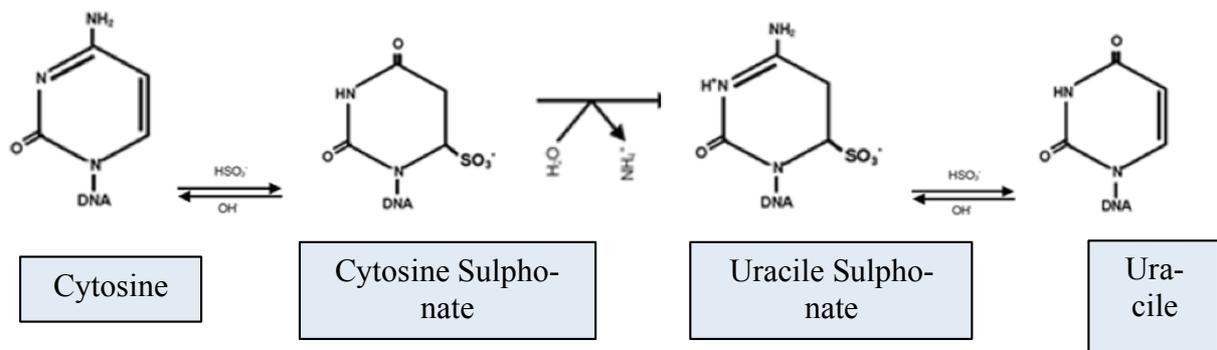


Figure 10. Le traitement au bisulfite permet de transformer des cytosines non méthylées en uracile.

### ***a/2. Amplification ADN de génome entier***

L'ADN traité par bisulfite a été soumis à amplification à l'aide d'une amorce aléatoire et d'une DNA polymérase. Les produits ont été par la suite fragmentés par activité enzymatique, purifiés, dénaturés puis appliqués à la puce.

### ***a/3. Hybridation***

La puce contient deux puits pour chaque CpG étudié. Chaque puits contient une séquence de cinquante nucléotides différant uniquement à l'extrémité libre. L'une correspond à la séquence d'ADN contenant une cytosine méthylée, l'autre contient la même séquence avec une cytosine non-méthylée (convertie en uracile puis amplifiée en thymine). L'hybridation est suivie de l'extension par un dideoxynucléotide marqué d'un haptène. Le ddCTP est marqué d'une biotine alors que les ddATP, ddGTP et ddUTP sont marqués par du 2,4-dinitrophénol.

### ***a/4. Fluorescence et scannage de la puce***

Une analyse immunohistochimique a ensuite été conduite par plusieurs tours de coloration, à l'aide de différents anticorps, afin de différencier les deux types de cytosines. La puce a été scannée afin de différencier les intensités des puits contenant les formes méthylées ou non-méthylées. Un ratio de 1 correspond à la forme méthylée, alors qu'un ratio de 0 à la forme non-méthylée.

## **b/ Analyse des données de méthylation**

A l'aide du logiciel *Illumina GenomeStudio software*, une analyse bioinformatique a été réalisée attribuant à chaque CpG une valeur  $\beta$  correspondant au taux de méthylation du CpG. La normalisation de ces données a permis ensuite de pouvoir comparer la méthylation de patients exposés aux non-exposés, en fonction de plusieurs modèles.

## ***b/1. Normalisation des données***

Cette étape a été réalisée avec l'équipe du Centre de Pharmacogénomique de l'Université de Montréal. Seize méthodes de normalisation ont été testées à l'aide du pack *WateRmelon* (logiciel R).

Les données de méthylation initiales contenaient 485 577 CpGs, après normalisation et nettoyage des données. 411 947 CpGs ont été conservés pour l'analyse finale.

Les étapes de nettoyage et de normalisation ont compris : une vérification du sexe entre le fichier du phénotype et les données de méthylation, l'évaluation de la concordance entre deux échantillons d'un même individu et la détermination de la meilleure méthode de normalisation. Seize méthodes de normalisations ont été testées à l'aide du pack *wateRmelon* afin de trouver la meilleure méthode (*dasen*, *nasen*, *danes*, *nanes*, *BMIQ*, *danet*, *daten1*, *daten2*, *fuks*, *nanet*, *naten*, *raw*, *danen*, *betaqn*, *tost* et *swan*). Ces différentes méthodes statistiques permettent de calculer l'index de méthylation  $\beta$  à partir des intensités de signaux méthylés ou déméthylés. Pour chaque méthode, des données normalisées ont été produites, un calcul des mesures pour Illumina Infinium type I et II a été effectué et les méthodes ont été ensuite classées (à l'exception de *swan* n'ayant produit aucun résultat). La meilleure méthode de normalisation a été *dasen*. Les étapes de nettoyage ont compris l'élimination des individus sans résultats, les discordances de sexe ou de génotype, les échantillons avec  $\geq 1$  % des sites avec une valeur p de détection  $\geq 0.05$ , les sonde avec un nombre de puits  $< 3$  dans  $\geq 5$  % des échantillons, les sondes avec  $\geq 1$  % d'échantillons avec un p de détection  $\geq 0.05$ . De plus, les sondes des chromosomes X et Y, avec un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sur le site CpG, et les sondes non-spécifiques correspondant à plus d'une location sur le génome ont été supprimées.

## ***b/2. Recherche d'un modèle***

Afin de contrôler de possibles facteurs confondants, pour chaque CpG, 8 modèles ont été testés afin de comparer exposés *versus* non-exposés :

- Modèle (1) : Méthylation = exposition (exposés versus non exposés).
- Modèle (2) : Méthylation = exposition + psychose
- Modèle (3) : Méthylation = exposition + âge + sexe
- Modèle (4) : Méthylation = exposition + psychose + âge + sexe
- Modèle (5) : Méthylation = exposition + famille
- Modèle (6) : Méthylation = exposition + psychose + famille
- Modèle (7) : Méthylation = exposition + âge + sexe + famille
- Modèle (8) : Méthylation = exposition + psychose + âge + sexe + famille

## ***b/3. Étude par gène***

Une étude par gène a ensuite été réalisée, une valeur p a été assignée à chaque groupe de CpG correspondant à un gène. La définition d'un gène a été basée sur le catalogue de données fourni par Illumina. L'étude par gène est validée pour améliorer la puissance statistique, mais aussi pour une meilleure organisation et interprétation des données.

### *Hypothèse de l'étude par gène*

Un gène  $G$  contenant un certain nombre de CpGs nous avons testé l'hypothèse nulle

$H_0: \beta_p = 0$  pour tout probe  $p$  dans  $G$ .

Nous avons considérés trois hypothèses alternatives. L'hypothèse *up*  $H_u : \beta_p > 0$  pour au moins un  $p$  dans  $G$ . L'hypothèse *down*  $H_d : \beta_p < 0$  pour au moins un  $p$  dans  $G$ . L'hypothèse mixte  $H_m : \beta_p \neq 0$  pour au moins un  $p$  dans  $G$ . Il est donc possible pour plus d'une hypothèse d'être vraie dans un même gène.

Le seuil de significativité des analyses par gène a été établi à  $P = 1.60 \times 10^{-6}$  (0.05/31162 gènes analysés).

#### ***b/4. Choix du modèle : QQ Plots***

Un *QQ (Quantile-Quantile) plot* est un diagramme de probabilité qui utilise une méthode graphique pour comparer deux distributions de probabilité en comparant leur quantiles l'un contre l'autre. L'étape initiale étant donc la définition de la taille des quantiles étudiés.

Un point de coordonnées (x, y) correspond à l'un des quantiles de la deuxième distribution (y) comparé au même quantile de la première distribution (x). Si les deux distributions comparées sont similaires, le tracé va suivre un axe  $x=y$ . Si les deux distributions s'accordent linéairement, le *QQ plot* suivra une ligne mais pas nécessairement l'axe  $x=y$ . Si la tendance générale du *QQ plot* est plus plate que l'axe  $y = x$ , la distribution étudiée sur l'axe horizontal est plus dispersée que la verticale. A l'inverse, si la tendance du *QQ plot* est plus élevée que la ligne  $x=y$ , la distribution étudiée verticalement est plus dispersée que la population étudiée horizontalement.

Les *QQ plots* sont le plus souvent utilisés pour comparer un modèle théorique avec un ensemble de données étudiées. Ils sont ici utilisés pour évaluer la qualité des différents modèles (figures 11 et 12).

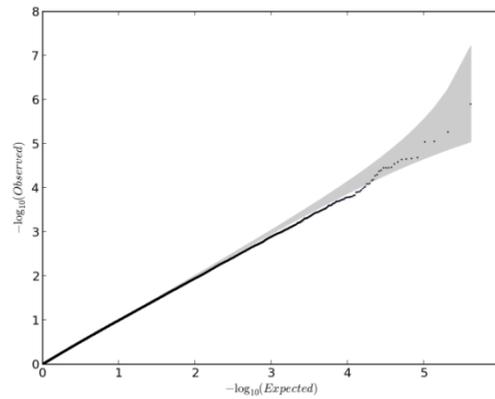


Figure 11. *Quantile-quantile (QQ) plots* des log10 (valeurs P) observés versus attendus sous l'hypothèse nulle. Modèle 7 par CpG : Méthylation = exposition + âge + sexe + famille.

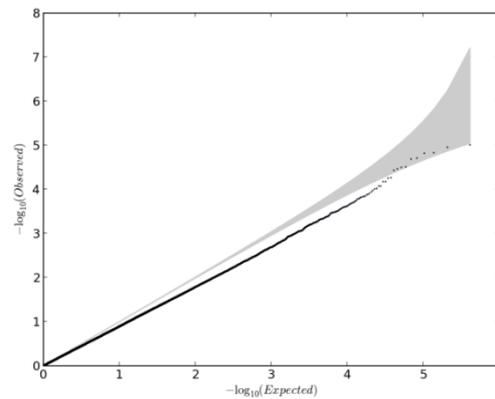


Figure 12. *Quantile-quantile (QQ) plots* des log10 (valeurs P) observés versus attendus sous l'hypothèse nulle. Modèle 8 par CpG : Méthylation = exposition + âge + sexe + famille + psychose.

Le modèle suivant a été choisi =

Modèle (8) : Méthylation = exposition + psychose + âge + sexe + famille

En effet, si le *QQplot* correspondant au modèle 7 semble de meilleure qualité que celui du modèle 8, nous avons préféré choisir un modèle ajusté sur la psychose. En effet, comme vu précédemment, plusieurs arguments amènent à penser que la présence d'un diagnostic de psychose peut induire des différences de méthylation indépendamment du facteur d'exposition ici étudié.

# RÉSULTATS

## 1. Diagnostics psychiatriques

Les interviews en face à face des patients inclus ont permis de recenser, ou de poser, des diagnostics de maladies psychiatriques, selon les critères diagnostiques du DSM-IV-TR (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*). Pour chaque famille, en fonction de l'exposition au diethylstilbestrol, ont ainsi pu être dessinés des arbres généalogiques faisant figurer les différents diagnostics psychiatriques présents. La figure 13 illustre l'exemple de la famille 143.



Figure 13. Arbre généalogique incluant les données des diagnostics psychiatriques en fonction de l'exposition. La famille R01-143 comporte un frère exposé non malade, deux sœurs exposées non malades et une sœur non-exposée malade.

La population étudiée comportait 41 patients exposés et 34 non-exposés. Les 2 groupes étaient comparables sur l'âge et le sexe. De façon attendue, la prévalence des maladies psychiatriques dans chaque groupe était supérieure à celle de la population générale. De façon statistiquement significative, la proportion de patients atteints de schizophrénie était supérieure chez les patients exposés au diethylstilbestrol en comparaison aux non-exposés (tableau 5).

	EXPOSÉS n = 41	NON- EXPOSÉS n = 34	p
Hommes	14 (34,1%)	13 (38,2%)	0,810
Âge (ans)	43,2	42,2	0,469
Schizophrénie	8 (19,5%)	0 (0,0%)	0,007
Dépression	20 (48,8%)	15 (44,1%)	0,817
Bipolarité	3 (7,3%)	2 (5,9%)	1,000
Trouble anxieux	7 (17,1%)	3 (8,8%)	0,333
Toutes pathologies psychiatriques	38 (92,7%)	22 (64,7%)	0,036

Tableau 5. Description clinique de la population étudiée.

## **2. Données neurodéveloppementales**

Le tableau 6 regroupe les différents résultats obtenus. Nous avons inclus dans les analyses cliniques l'ensemble des membres de familles déjà incluses sur la puce (parents, frères, sœurs). Nous avons réalisé un test ANOVA univarié (modèle 1) en comparant les moyennes obtenues pour chaque test entre les groupes exposés et non-exposés. Du fait de l'inclusion dans l'analyse d'une génération supplémentaire non-exposée (parents), nous avons également réalisé un test ANOVA multivarié en ajustant sur l'âge (modèle 2).

Echelles	Exposition	Analyses descriptives			Modèle univarié <sup>b</sup>			Modèle ajusté sur l'âge <sup>b</sup>		
		N <sup>c</sup>	Mean	SD	F	p	η <sup>2</sup>	F	p	η <sup>2</sup>
GAF	Non-Exp.	28	79,750	10,613	36,477	<0,001*	0,448	40,554	<0,001*	0,469
	Exp.	20	56,600	14,601						
Fluence	Non-Exp.	40	97,600	15,120	0,517	0,475	0,009	0,727	0,398	0,013
	Exp.	18	94,111	20,953						
MADRS	Non-Exp.	10	10,000	9,006	0,013	0,911	0,001	0,025	0,877	0,001
	Exp.	14	10,429	9,296						
Waldrop	Non-Exp.	34	3,441	2,389	0,189	0,666	0,004	0,306	0,582	0,006
	Exp.	19	3,737	2,353						
NSS 23	Non-Exp.	34	9,765	7,328	0,137	0,713	0,003	5,547	0,023*	0,102
	Exp.	18	10,472	4,729						
Latéralisation	Non-Exp.	33	,364	0,742	4,427	0,041*†	0,084	6,596	0,013*	0,123
	Exp.	17	,941	1,197						
Coordination Motrice	Non-Exp.	33	4,788	3,704	0,005	0,944	<0,001	3,516	0,067	0,068
	Exp.	18	4,861	3,124						
Intégration Motrice	Non-Exp.	33	1,591	1,796	0,173	0,679	0,004	1,179	0,283	0,024
	Exp.	18	1,389	1,356						
Mouvements Anormaux	Non-Exp.	32	,438	0,749	0,674	0,416	0,014	1,644	0,206	0,034
	Exp.	18	,639	0,967						
Intégration Sensorielle	Non-Exp.	34	2,809	2,313	0,031	0,862	0,001	8,526	2,216	0,143
	Exp.	18	2,694	2,101						
QL	Non-Exp.	34	-0,455	1,252	1,315	0,257	0,026	1,424	0,238	0,028
	Exp.	18	-0,854	1,070						
BPRS Total	Non-Exp.	62	28,242	5,950	23,552	<0,001*	0,206	17,231	<0,001*	0,220
	Exp.	31	37,129	11,758						
BPRS ST1	Non-Exp.	62	10,048	3,569	19,885	<0,001*	0,179	11,727	0,001*	0,161
	Exp.	31	14,355	5,707						
BPRS ST2	Non-Exp.	62	7,484	1,388	5,457	0,022	0,057	6,605	0,013*	0,098
	Exp.	31	8,516	2,885						
BPRS ST3	Non-Exp.	62	7,774	1,683	16,069	<0,001*	0,150	9,392	0,003*	0,133
	Exp.	31	10,742	5,348						
BPRS ST4	Non-Exp.	62	4,242	0,717	6,999	0,010*	0,071	7,300	0,009*	0,107
	Exp.	31	4,936	1,806						
BPRS ST5	Non-Exp.	62	10,823	2,677	9,907	0,002*	0,098	16,518	<0,001*	0,213
	Exp.	31	13,097	4,261						
DTD Total	Non-Exp.	28	1,429	2,201	2,632	0,111	0,048	0,888	0,353*	0,026
	Exp.	26	2,577	2,969						

Tableau 6. Analyse des données neuropsychologiques en fonction de l'exposition. \* Le nombre d'inclus peut varier du fait de la réalisation ou non du test. <sup>b</sup> Analyse de variance en utilisant un modèle ANOVA. \* p < 0,05. † Significativité non retrouvée en test non paramétrique. Sous scores BPRS. BPRS ST1 : Dépression, anxiété, affects. BPRS ST2 : Psychose. BPRS ST3 : Symptômes négatifs ou retrait. BPRS ST4 : Hostilité, suspicion. BPRS ST5 : Activation.

Nous observons des différences significatives pour plusieurs sous-scores de la BPRS (*Brief Psychiatric Rating Scale*, voir Annexe 1), notamment les scores de dépression/anxiété/affects (BPRS ST1), de psychose/pensée désorganisé (BPRS ST2), de symptômes négatifs (BPRS ST3), d'hostilité/suspicion (BPRS ST4) et d'activation BPRS ST5).

Après ajustement sur l'âge, le score total des signes morphologiques mineurs (NSS, *Neurological Soft Signs*) diffère aussi entre les groupes, notamment sur les scores de latéralisation.

Le score de fonctionnement global (GAF) est significativement différent entre les deux groupes pour les deux modèles.

### **3. Données sur la méthylation de l'ADN**

#### **A/ Niveau de méthylation global entre exposés et non-exposés**

Aucune modification significative globale du niveau de méthylation entre patients exposés et non-exposés n'a été observée ( $p=0.763$ ). Ce niveau a été calculé à l'aide du logiciel SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) comme la différence entre les moyennes des changements de méthylation pour tous les CpGs entre les individus exposés et non-exposés.

## B/ Niveaux de méthylation spécifiques par CpG ou par gène entre patients exposés et non-exposés.

Les modifications de niveau de méthylation, pour une CpG donnée, associées à l'exposition au diethylstilbestrol sont représentées dans le *manhattan plot* (figure 14, voir aussi le top 100 CpG dans le tableau 7). Aucune de ces modifications n'atteint un niveau de signification au niveau du génome complet. Nous avons décidé de poursuivre nos explorations en analysant le top 100 des CpGs avec le plus haut niveau de significativité, compris entre  $1.25 \times 10^{-6}$  et  $5.12 \times 10^{-4}$ .

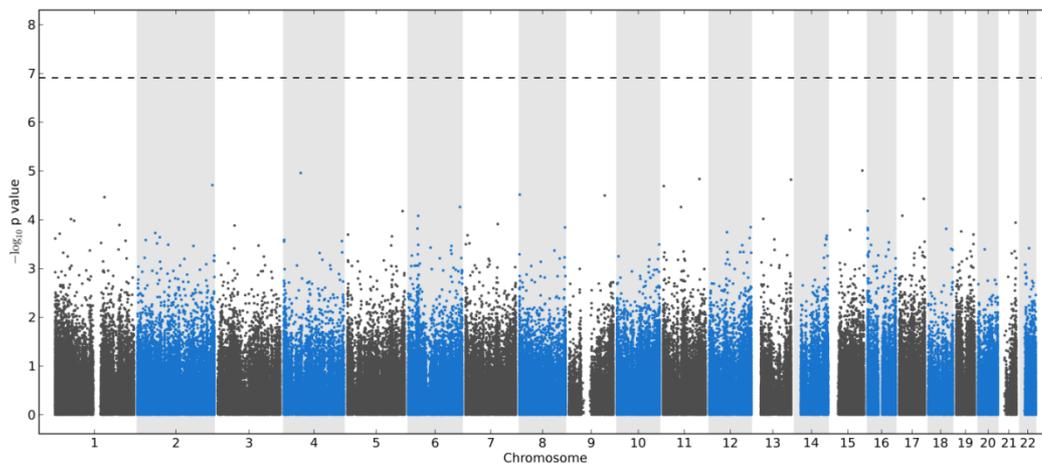


Figure 14. Manhattan Plot pour le modèle 8 par CpG. Aucune CpG n'atteint une valeur p statistiquement significative dans le modèle 8.

ProbeID	Chromosome	Position	Gène	Valeur P
cg10171357	15	96910540		9.82 x 10 <sup>-6</sup>
cg19216561	4	53750116	SCFD2	1.1 x 10 <sup>-5</sup>
cg07991055	11	115027871		1.47 x 10 <sup>-5</sup>
cg25320816	13	114099871	ADPRHL1	1.51 x 10 <sup>-5</sup>
cg03742137	2	236504280	AGAP1	1.95 x 10 <sup>-5</sup>
cg03118430	11	2482233	KCNQ1	2.04 x 10 <sup>-5</sup>
cg12972705	8	1915076		3.07 x 10 <sup>-5</sup>
cg21218854	9	113342396	SVEP1	3.2 x 10 <sup>-5</sup>
cg11572390	1	156252937	SMG5, TMEM79	3.44 x 10 <sup>-5</sup>
cg03066080	17	77539424		3.73 x 10 <sup>-5</sup>
cg22180298	6	163731903	LOC285796, PACRG	5.48 x 10 <sup>-5</sup>
cg21049376	11	57120097	P2RX3	5.49 x 10 <sup>-5</sup>
cg08521396	16	1060545		6.6 x 10 <sup>-5</sup>
cg11411838	5	173631551		6.7 x 10 <sup>-5</sup>
cg20186473	17	10081280	GAS7	8.3 x 10 <sup>-5</sup>
cg03421270	6	32064153	TNXB	8.31 x 10 <sup>-5</sup>
cg09185773	13	27132773	WASF3	9.59 x 10 <sup>-5</sup>
cg17742781	1	50834056		9.71 x 10 <sup>-5</sup>
cg11231291	1	60539932	C1orf87	0.000105

Tableau 7. Top 20 des sites CpG différenciellement méthylés, classés par significativité statistique. Modèle 8. (Seuil de significativité  $P=1.21 \times 10^{-7}$ ).

L'approche par gène n'a pas permis de retrouver un gène présentant une différence de méthylation suffisante pour atteindre un niveau significatif dans les trois modèles considérés : *up-methylation*, *down-methylation* ou *mixed-methylation*.

### ***b/1. Analyses de réseaux***

Nous avons réalisé des analyses de réseaux avec surreprésentation, en utilisant la base en ligne *ConsensusPathDB*, afin d'établir si nos meilleurs résultats étaient susceptibles d'intervenir dans des réseaux biologiques de façon significative. Pour cela nous avons inclus la liste des gènes correspondant au top 100 CpG et avons effectué une analyse de surreprésentation. Le tableau 8 montre les résultats obtenus.

Réseau	Candidats contenus	Valeur q*	Source	Fonction
VEGF hypoxie and angiogenèse	2	0,0385	PID	Oncogenèse
rôle de mef2d dans l'apoptose des cellules t	2	0,0385	PID	Oncogenèse
Réseau de signalisation de bcr	2	0,0385	PID	Oncogenèse
Réseau de signalisation du calcium	4	0,0385	KEGG	Signalisation générale
Réseau de surveillance des mRNA	3	0,0385	KEGG	Signalisation générale
Réseau de signalisation de la famille des protéines G	2	0,0385	PID	Signalisation générale
Signalisation médiée par les récepteurs de l'acide rétinoïque	2	0,0385	PID	Signalisation générale
Expression et traitement pré-NOTCH	2	0,0385	Reactome	Signalisation générale
Réseau de signalisation Wnt et pluripotence	3	0,0385	Wikipathways	Signalisation générale
TNFalpha	5	0,0338	NetPath	Inflammation
Expression des chémokines induites par fmlp dans les cellules hmc-1	2	0,0385	PID	Inflammation
Synapse GABAergique	4	0,0299	KEGG	Système nerveux

Synapse cholinergique	4	0,0338	KEGG	Système nerveux
Synapse dopaminergique	4	0,0338	KEGG	Système nerveux
Addiction à la morphine	3	0,0385	KEGG	Système nerveux
Signalisation rétrograde endocannabinoïde	3	0,0385	KEGG	Système nerveux
Synapse sérotoninergique	3	0,0453	KEGG	Système nerveux
Synapse glutamatergique	3	0,0453	KEGG	Système nerveux
Sclérose Amyotrophique latérale	2	0,0427	Reactome	Système nerveux
Interactions NCAM1	2	0,0453	Reactome	Système nerveux
Activation des récepteurs GABAB	2	0,0453	Reactome	Système nerveux
Signalisation adrénérgique dans les cardiomyocytes	5	0,0299	KEGG	Spécifique
Métabolisme des composés séléniques	2	0,0338	KEGG	Spécifique
Sécrétion d'acide gastrique	3	0,0385	KEGG	Spécifique
Entrainement circadien	3	0,0385	KEGG	Spécifique
Mélanogenèse	3	0,0385	KEGG	Spécifique

Réseau Beta-agoniste/Beta-bloquant	3	0,0338	PharmKGB	Spécifique
Effets de la calcineurine sur la différenciation des kératinocytes	2	0,0338	PID	Spécifique
Role de la signalisation des NFAT calcineurine-dépendant dans les lymphocytes	3	0,0338	PID	Spécifique

Tableau 8. Analyse de réseaux par *ConsensusPathDB*.

\*les valeurs p sont corrigées pour les tests multiples en utilisant les taux des faux positifs.

## **b/2. Carte des variations de méthylation**

Cette analyse a été réalisée en utilisant le logiciel *MultiexperimentViewer* (version 4.9.0) <sup>49</sup>. Nous avons sélectionné les tops 100 CpGs. Les phénotypes individuels (exposition ou non-exposition) ainsi que les taux de méthylation  $\beta$  ont été renseignés pour chaque individu. Nous avons réalisé une analyse de significativité pour puce (*Significant Analysis for MicroArray*). Le clustering hiérarchique des 100 tops CpGs permet de discriminer les exposés des non-exposés. (figure 15).

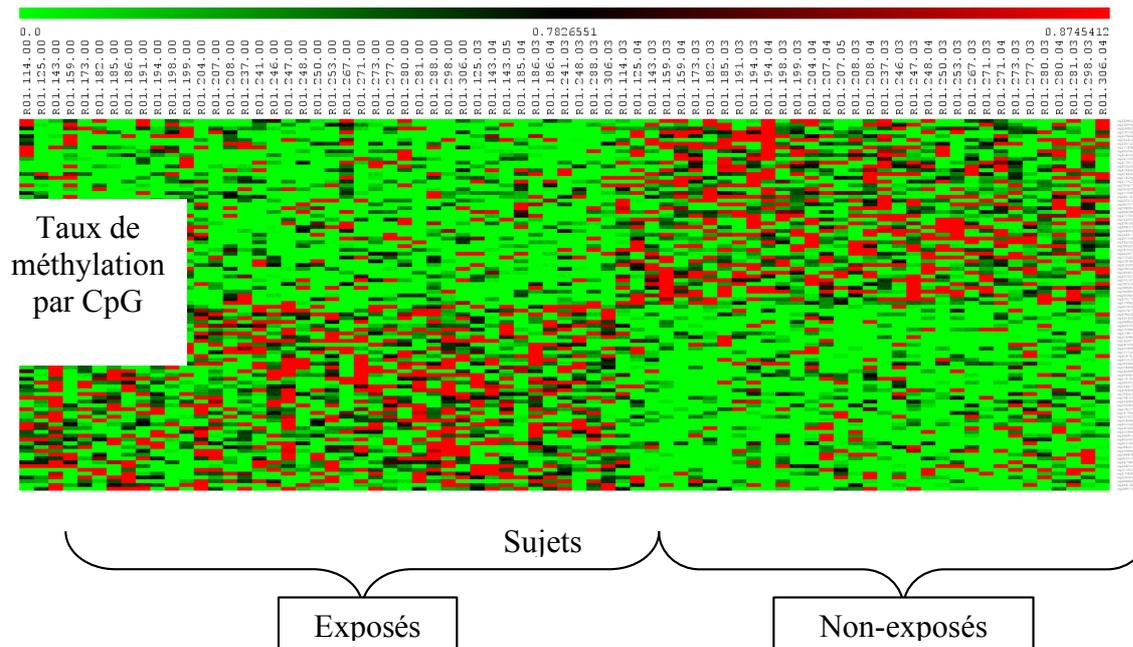


Figure 15. HeatMap des top100 CpG. En abscisse, l'ensemble des sujets inclus dans l'étude. En ordonnée les tops 100 CpGs. Plus la couleur s'oriente vers le rouge plus le taux de méthylation  $\beta$  est proche de 1. Plus elle s'oriente vers le vert, plus le taux de méthylation  $\beta$  est proche de 0.

### ***b/3. Analyses par fratries***

Nous avons ensuite choisi de comparer les schémas de méthylation entre paires de frères et sœurs discordantes pour l'exposition au diethylstilbestrol avec paires de frères et sœurs concordantes pour la non-exposition. Ces études de discordance versus concordance sont particulièrement utilisées chez des paires de jumeaux<sup>50</sup>. Ceux-ci partageant un matériel génétique commun, elles permettent d'étudier les facteurs discordants liés à l'environnement. Dans le cas de l'exposition in utero au diethylstilbestrol, la discordance entre jumeaux à l'exposition est théoriquement inexistante, d'où l'utilité de paires issues d'une même fratrie, ne partageant que 50% de leur matériel génétique en commun.

Nous avons ainsi comparé :

- les différences des taux de méthylation entre paires discordantes (un individu exposé et un individu non-exposé)

- aux différences des taux méthylation entre paires concordantes (deux individus non-exposés).

$$\Delta = |\beta^{NE} - \beta^E| - |\beta^{NE} - \beta^{NE}|$$

↙
↘

Paire discordante
Paire concordante

La figure 16 représente les différentes possibilités attendues.

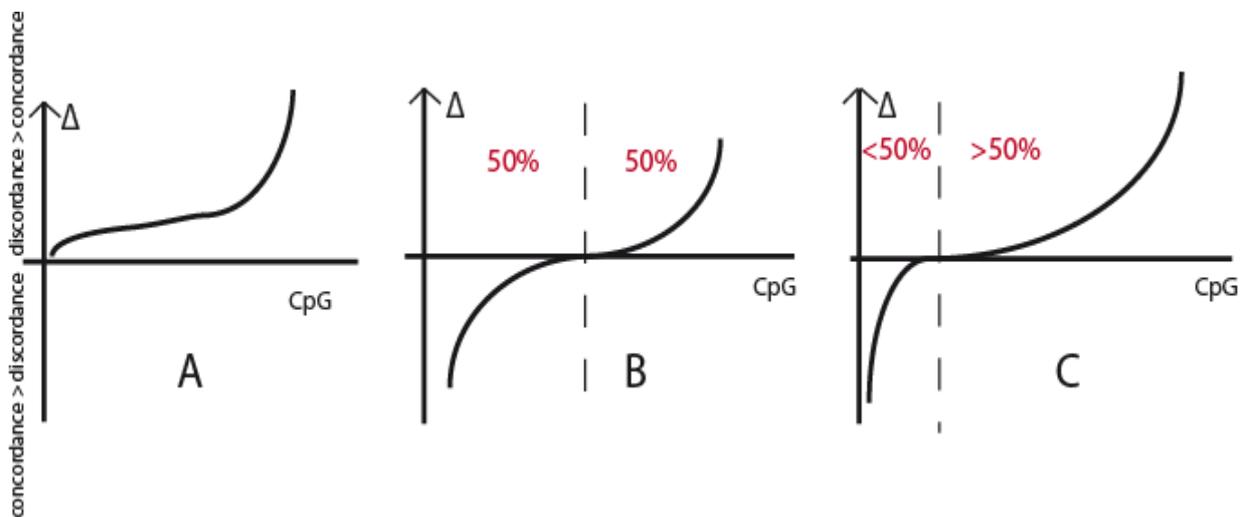


Figure 16.

La figure A ci-dessus représenterait le cas hypothétique où l'exposition au diethylstilbestrol se traduirait par des différences de méthylation entre fratries concordantes et discordantes pour l'ensemble des CpGs étudiées.

L'aspect symétrique de la figure B serait en faveur de l'absence d'effet lié à l'exposition au diethylstilbestrol.

La figure C suggérerait une participation de l'exposition au diethylstilbestrol ainsi que l'existence d'autres facteurs (effets environnementaux non partagés, participation génétique) ayant une influence sur les différences de méthylation observées.

En appliquant ce concept au top 100 CpGs nous obtenons les résultats présentés dans la figure 17. Nous retrouvons ici 64 CpGs ayant une différence positive et 36 négative, cette observation peut donc traduire un effet dysméthylant du diethylstilbestrol (test chi-2 :  $p = 0.04554$  versus une répartition de 50/50 attendue en l'absence d'effet dysméthylant du diethylstilbestrol).

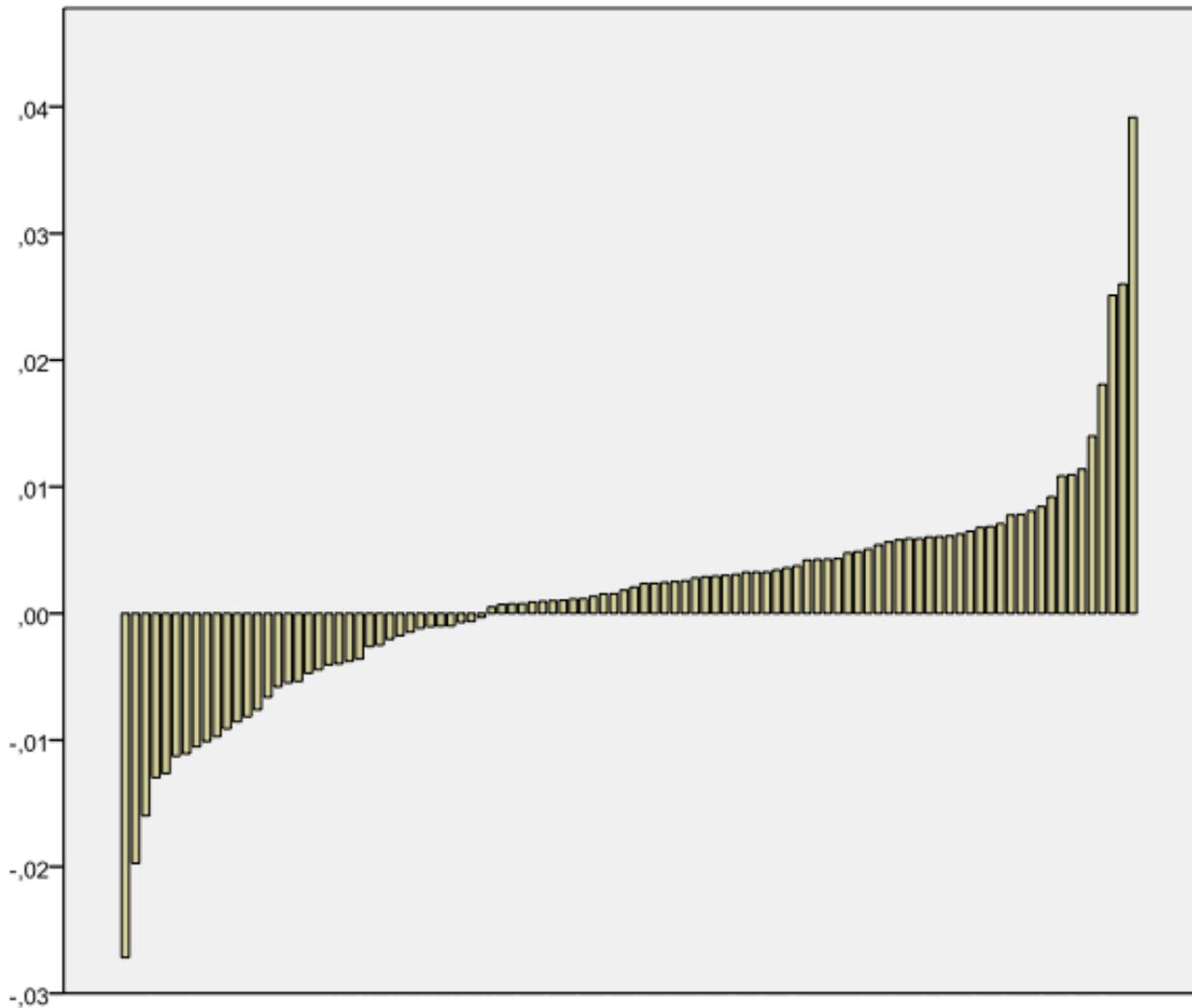


Figure 17. Différence des moyennes des paires discordantes et des paires concordantes non exposées pour le top 100 CpG. En abscisse les CpGs, en ordonnées les différences de moyenne.

La figure 18 est présentée ici à titre d'exemple, elle illustre les analyses effectuées pour une CpG donnée. Elle n'est pas représentative de l'ensemble des CpG ni de l'ensemble des familles analysées.

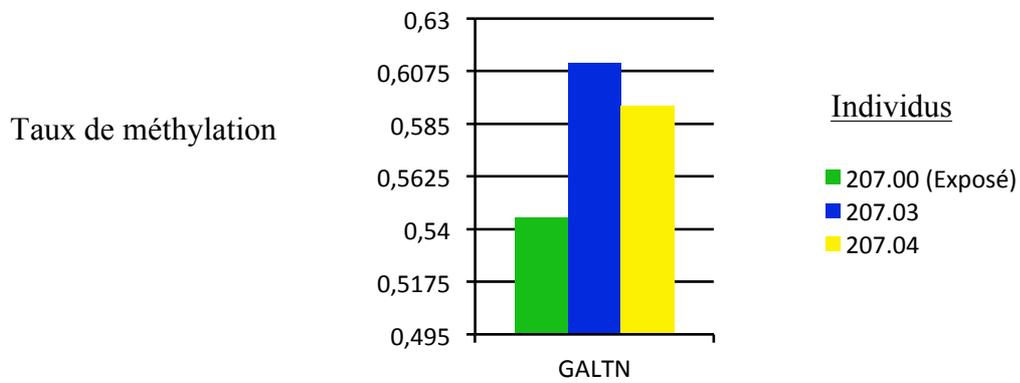
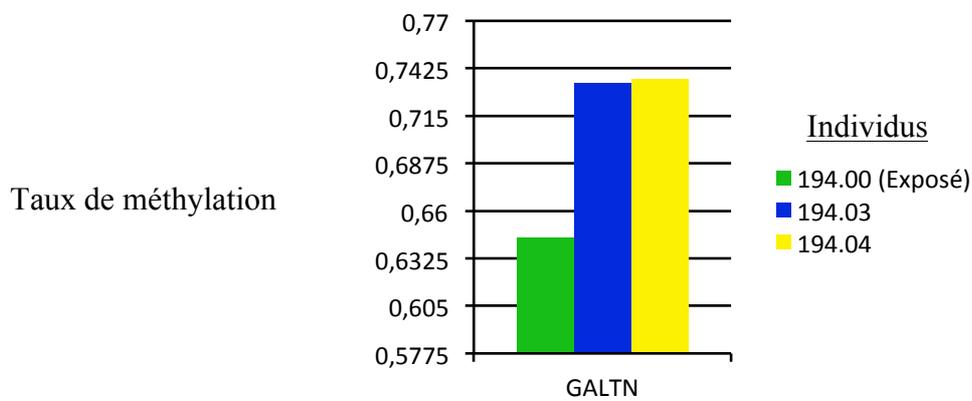
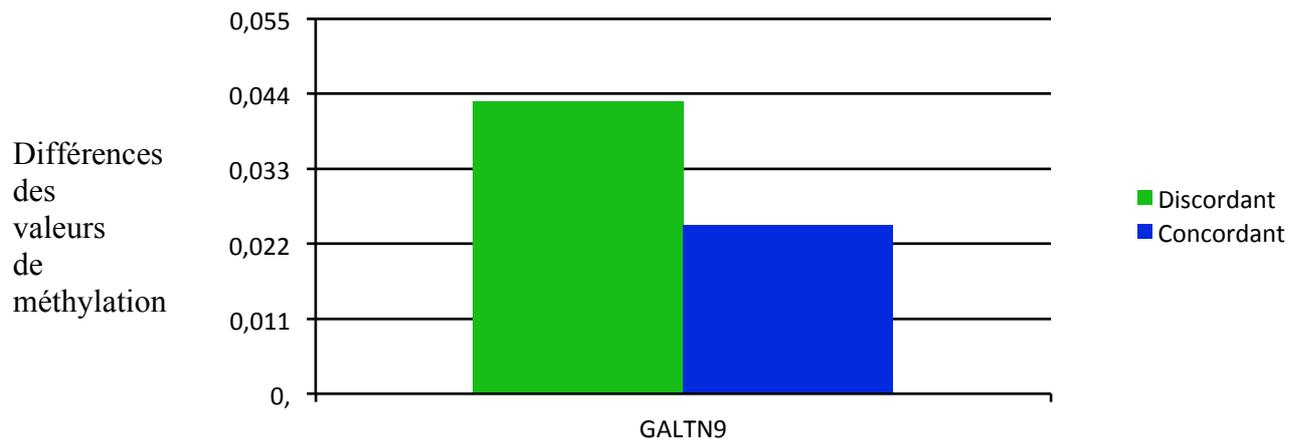


Figure 18. Différences des valeurs de méthylation entre paires discordantes et concordantes non-exposées. Exemple de la cg05210239 (gène *GALTN9*).

# DISCUSSION

## 1. Perturbateurs endocriniens et neurodéveloppement

De plus en plus de travaux argumentent qu'un certain nombre de perturbateurs endocriniens pourraient altérer la transmission neuronale, ainsi que la formation des neurites. En matière de santé publique, des questions se posent quant à un lien possible entre l'augmentation de l'exposition aux perturbateurs endocriniens et l'augmentation d'incidence des troubles neurodéveloppementaux.

Sur le plan clinique, nous retrouvons une différence de symptomatologie psychiatrique rapportée entre exposés et non-exposés sur plusieurs items de la BPRS, l'ensemble de ses sous-scores et certains items individuellement. Les signes neurologiques mineurs et les scores de latéralisation, après ajustement sur l'âge, paraissent également différents, tout comme le score de fonctionnement global.

Sur le plan épigénétique, nos résultats indiquent que, plutôt que d'être associée à des changements globaux de méthylation, l'exposition prénatale au diethylstilbestrol est associée à des modifications de méthylation spécifiques. Aucune de ces modifications n'atteint un niveau de significativité au niveau du génome complet. Ces altérations sont néanmoins significativement surreprésentées au niveau de gènes impliqués dans des voies biologiques potentiellement responsables de l'émergence des troubles psychiatriques.

L'analyse par fratrie retrouve des différences de méthylation plus grande chez les paires discordantes, argumentant pour un effet dysméthylant du diethylstilbestrol.

## **A/ Arguments pour une perturbation du neurodéveloppement**

De nombreux travaux sur modèles animaux apportent aujourd'hui la preuve d'une association entre anomalies neurodéveloppementales et exposition à des perturbateurs endocriniens. Citons l'exemple des pesticides organophosphorés qui représentent plus de 50% des pesticides. Le chlorpyrifos (CPF) est le plus répandu dans cette classe. Contrairement à certains pesticides présentant uniquement un effet neurotoxique aigu, son exposition gestationnelle et néonatale altère la différenciation neuronale, la synaptogenèse et l'expression génique chez le rat et affecte la transmission sérotoninergique et dopaminergique avec un dimorphisme sexuel<sup>51</sup>. Une altération du potentiel de myélinisation chez le rat exposé au bisphénol A a également été mis en évidence, notamment au niveau de l'hippocampe<sup>52</sup>.

## **B/ Arguments pour une perturbation des fonctions cognitives**

Sur le plan des fonctions cognitives, des effets, spécifiques au sexe, liés aux perturbateurs endocriniens œstrogéniques ont été observés chez les « Yu-Cheng boys » (entre 1978 et 1979 plus de 2000 taïwanais ont ingérés par accident de l'huile de riz contaminé en PCBs). Ces garçons ont montré des difficultés cognitives, notamment d'apprentissage dans l'espace, supérieures aux filles exposées<sup>53</sup>. Ces résultats ont pu également être observés chez le rat mâle, pour qui l'exposition prénatale et lactationnelle au PCBs semblent coïncider avec des difficultés d'orientation spatiale<sup>54</sup>. Inversement, certaines études ont mis en avant une amélioration de certaines fonctions cognitives suite à l'exposition à des perturbateurs endocriniens. Ainsi, l'exposition de rats mâles au 17 $\alpha$ -ethynil œstradiol du cinquième jour gestationnel au sevrage s'est traduite par une amélioration de la mémoire de travail durant une épreuve du labyrinthe de Morris<sup>55</sup>. Enfin des études plus récentes autour de l'exposition prénatale au bisphénol A ne retrouvent pas d'effets significatifs sur les performances dans les épreuves de labyrinthe que ce soit chez le mâle ou chez la femelle<sup>56</sup>. Ces observations soulignent

à la fois l'impact de l'exposition aux perturbateurs endocriniens sur les fonctions cognitives du développement à l'âge adulte mais aussi la complexité de l'interprétation des résultats comportementaux observés.

### **C/ Arguments pour une perturbation des aspects comportementaux**

Plusieurs études ont mis en évidence que l'exposition aux perturbateurs endocriniens altère les réponses comportementales chez le rat. L'exposition in utero au CPF induit une réponse de type agressive lors de test de comportement chez le rat mâle adulte et adolescent. Chez la femelle adulte, une modification des interactions sociales est également observée face à l'individu de même sexe ou de sexe opposée dans les tests de défense du nid<sup>57-60</sup>. L'exposition prénatale de souris au diethylstilbestrol, se traduit également par une augmentation de la réponse agressive au même sexe<sup>61</sup>. Tanaka et al., après avoir administré des faibles doses de diethylstilbestrol à des souris en périnatal (0.3 ou 3 µg/kg entre les jours de gestations 11 et 17 et entre les jours postnataux 2 et 6), ont observé une augmentation significative de l'activité en champ ouvert des mâles et des femelles, ainsi qu'un évitement passif de moins bonne qualité chez les mâles. Ils corrélerent ces observations à une augmentation significative du nombre de récepteurs œstrogéniques  $\alpha$  dans la région du noyau ventromédial de l'hypothalamus<sup>62</sup>. Chez le rat, l'exposition au bisphénol A durant différentes étapes du développement a également pu mettre en exergue l'apparition de comportements hyperactifs<sup>63</sup>, l'altération des comportements exploratoires<sup>64,65</sup> ainsi qu'une majoration de l'anxiété<sup>66,67</sup>, avec toujours un dimorphisme sexuel. Concernant la réponse au stress, bien que quelques études commencent à mettre en évidence un lien entre perturbateurs endocriniens et altération de la réponse au stress oxydatif<sup>68</sup>, les résultats sont encore peu nombreux et nécessitent des explorations supplémentaires. Chez l'homme, l'exposition aux métaux lourds, au mercure ou encore au PCBs a été associée à des troubles du comportement divers<sup>69,70</sup>. Chez les enfants exposés au mercure, au plomb et au PCBs ont été retrouvés une augmentation des symptômes d'hyperactivité, d'inattention<sup>71</sup> ainsi que des comportements antisociaux et d'agressivité<sup>72</sup>. L'exposition prénatale au bisphénol A a été associée à des comportements d'externalisation plus importants chez la fille de deux ans<sup>73</sup>. Une association a par ailleurs été retrou-

vée entre exposition prénatale aux substances perfluoralkylées et risque d'épilepsie spastique uni et bilatérale chez le garçon <sup>74</sup>. Dans une étude récente de Hong, des taux urinaires de bisphénol A ont été mesurés chez 1089 enfants âgés de 8 à 11 ans. Ces taux ont été corrélés positivement à des troubles du comportement (score total de l'échelle *Child Behavior Checklist*) et négativement aux capacités d'apprentissage (quotient d'apprentissage du *Learning Disability Evaluation Scale*) <sup>75</sup>.

Enfin, des études récentes s'intéressent maintenant à un possible lien entre exposition aux perturbateurs endocriniens et neurodégénérescence. Une étude épidémiologique espagnole retrouve une association entre exposition aux pesticides et incidence de pathologies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson) <sup>76</sup>.

#### **D/ Mécanismes sous-jacents évoqués**

Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer comment l'influence des perturbateurs endocriniens sur le développement de certains circuits neuronaux pourrait expliquer les effets cliniques observés, sur les aspects cognitifs et comportementaux notamment.

De nombreux travaux épidémiologiques et expérimentaux ont montré que les perturbateurs endocriniens affectaient le système nerveux central en interagissant avec l'axe hypothalamo-pituitaire-thyroïdien, essentiel pour le développement cérébral. Un déficit de relargage de TRH et de TSH a en effet été rapporté par plusieurs études, ainsi qu'un déficit de la synthèse de T3 et de T4 par des perturbateurs tels que les pesticides, les phtalates et les PCBs <sup>77,78</sup>.

L'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien est également altéré après exposition notamment au bisphénol A. Les taux basaux d'hormones adrénocorticotrophines (ACTH) apparaissent majorés chez les mâles exposés en comparaison aux non-exposés, ce qui n'est pas observé chez les femelles. Après un stress, l'élévation des taux d'ACTH et de corticostérone était plus élevée chez les mâles que chez les femelles <sup>79</sup>.

L'apparition de troubles neuropsychiatriques secondaires à l'exposition aux perturbateurs endocriniens pourrait être le résultat de modifications dans la transmission mo-

noaminergique. Certains perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A perturbent le système mésolimbique dopaminergique en interrompant la synthèse, le relargage, et le turn-over de la dopamine, altérant le transporteur de la dopamine (DAT) et l'expression des récepteurs dopaminergiques<sup>80</sup>. De façon similaire, des modifications de la transmission sérotoninergique secondaires à une exposition pourraient résulter dans l'émergence de troubles dépressifs ou anxieux<sup>81</sup>.

Le système arginine vasopressine (VAP) est constitué de nonapeptides neurohypophysaires retrouvés dans les systèmes magnocellulaires et parvocellulaires de l'hypothalamus et du système limbique. Chez les mammifères, ce système module les comportements sociaux, et agressifs notamment<sup>82</sup>. L'administration d'œstrogènes et d'androgènes module l'expression d'AVP<sup>83</sup> et contribue en partie à la masculinisation de ce système<sup>84</sup>. De ce fait, le système AVP est considéré comme une possible cible des perturbateurs endocriniens<sup>85</sup>. En effet, chez le mammifère, l'exposition aigüe à l'estradiol stimule la production de l'ARNm d'AVP<sup>86</sup>. Chez le rat, l'exposition à certains phytoestrogènes induit une élévation de la sécrétion de vasopressine dans les extraits hypothalamiques<sup>87</sup>.

Un autre nonapeptide d'intérêt est l'ocytocine. Produit par les noyaux magnocellulaires, il est impliqué dans la reconnaissance sociale et dans les comportements maternels<sup>88</sup>. L'exposition au bisphénol A réduit certains comportements maternels liés à l'ocytocine<sup>9</sup>. Ces effets pourraient résulter de l'altération de l'expression des récepteurs centraux de l'ocytocine inductibles par les œstrogènes<sup>89</sup>. Chez le campagnol, l'exposition à de fortes doses de bisphénol A (50 mg/kg/jour) est associée à l'augmentation du nombre de neurones immunoréactif à l'AVP dans le noyau paraventriculaire antérieur et à une diminution du nombre de neurones immunoréactif à l'ocytocine dans le noyau paraventriculaire postérieur<sup>90</sup>.

Une étude récente de Kumamoto apporte des arguments pour une médiation liée à l'inactivation du X entre exposition au bisphénol A et apparition de troubles du neurodéveloppement. En effet, après exposition intra utero et néonatale à 50 mg/kg/jr de bisphénol A, une altération de l'expression de *Xist* et *Tsix* (facteurs de régulation de l'inactivation de l'X) ainsi que de *FMRI*, *GDII*, *NLGN3* et *PAK3* (gènes impliqués dans des troubles neurodéveloppementaux liés à l'X) est observée<sup>91</sup>.

Les perturbateurs endocriniens agissent via plusieurs classes de récepteurs : œstrogéniques, corticostéroïdiens, *peroxisome proliferator-activated* (PPAR)...Un mécanisme très étudié aujourd'hui est celui via la liaison aux récepteurs œstrogéniques. D'une part, par ce mécanisme, les perturbateurs endocriniens altèrent l'expression de réseaux de signali-

sation en aval (citons *esr* et *c-jun* dans les réseaux de l'apoptose <sup>92</sup> ou *ERK1/2* et son rôle sur la morphogenèse dendritique <sup>93</sup>), d'autre part ils altèrent l'expression elle-même des récepteurs œstrogéniques au niveau cérébral (de l'hypothalamus notamment) avec un dimorphisme sexuel <sup>94</sup>.

Sur le plan du développement des organes génitaux externes, Mahawong et al. ont observé que l'intensité des effets du diethylstilbestrol variait en fonction de leur degré de sensibilité aux œstrogènes <sup>95</sup>.

Sur un plan plus neurodéveloppemental, Tomihara et al. ont étudié la contribution du récepteur œstrogénique  $\alpha$  sur les effets de l'exposition prénatale au diethylstilbestrol et l'émotivité. Des souris enceintes, *knock-out* hétérozygotes pour le récepteur  $\alpha$ , se sont vues administrés du diethylstilbestrol (0,1  $\mu$ /j) entre les jours 11 et 17 de gestation. Le comportement émotionnel de la progéniture a été évalué à 5 semaines par des tests de transitions jour-nuit. Chez des souris sauvages, le diethylstilbestrol diminuait l'émotivité chez les femelles et l'augmentait chez les mâles. Chez les souris *knock-out*, ces effets sexe-dépendants étaient totalement abolis. Ces résultats suggèrent que les effets sexe-dépendants du diethylstilbestrol sur l'émotivité sont principalement produits par son action sur le récepteur œstrogénique  $\alpha$  <sup>96</sup>.

Ensemble, ces données pourraient expliquer comment les perturbateurs endocriniens peuvent affecter négativement les dimorphismes sexuels dans le cerveau <sup>97</sup>.

## **2. Théorie de la perturbation endocrinienne dans la schizophrénie.**

Suite à l'observation de similarités entre les effets d'une exposition au bisphénol A et les anomalies observées dans la schizophrénie, certains auteurs ont postulé récemment pour une théorie de la perturbation endocrinienne dans la schizophrénie.

Des anomalies des fonctions endocrines et neuroendocrines ont été observées de longue date dans la schizophrénie <sup>98,99</sup>. Elles incluent des altérations de la régulation de l'hormone de croissance (GH), de la prolactine (secondaires également aux antipsychotiques), des hormones de l'axe adrénocorticotrope et du cortisol, des effets sur la vasopressine et l'ocytocine et un possible effet protecteur des œstrogènes et de la progestérone <sup>98</sup>. Ces

études se sont focalisées sur la description du statut neuroendocrine du patient adulte atteint de schizophrénie ou sur son exposition prénatale à des altérations des glucocorticoïdes via des facteurs de stress <sup>100</sup>. Certains auteurs suggèrent encore que des facteurs responsables du développement normal des dimorphismes sexuels dans le cerveau adulte étant communs à certains facteurs de risque associés à la schizophrénie, ils pourraient bénéficier d'un effort de recherche particulier pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie <sup>101</sup>. Citons l'exemple de l'hypospadias, liés à la contraction de la grippe maternelle durant le 1<sup>er</sup> trimestre, tout comme la schizophrénie <sup>102,103</sup>. Les hypothèses actuelles s'interrogent donc sur l'exposition aux perturbateurs endocriniens qui pourraient majorer le risque de dimorphismes sexuels et de schizophrénie, via des mécanismes communs.

*Œstrogènes et schizophrénie* : Des taux bas en œstrogènes ont été associés avec des symptômes de schizophrénie chez l'homme <sup>104</sup> et chez la femme <sup>105</sup>. Le début plus tardif chez la femme a été corrélé avec l'effet protecteur de taux d'œstrogènes supérieurs <sup>106</sup>. De même, les variations des taux d'œstrogènes durant le cycle ont pu être mis en lien avec des variations dans l'intensité des symptômes observés.

*Hormones liées au stress et schizophrénie* : Les recherches sur les effets du stress dans la schizophrénie se sont beaucoup concentrées sur les élévations des taux de glucocorticoïdes. L'élévation chronique de glucocorticoïde chez le rat se manifeste par une altération de l'architecture hippocampale au niveau de l'arborescence dendritique <sup>107</sup> (des pics d'exposition aux glucocorticoïdes se traduisant par une dégénérescence préfrontale <sup>108</sup>). La levée d'inhibition chez les rongeurs est modulée par les corticoïdes, donc par les perturbateurs endocriniens, pouvant coïncider avec un modèle de schizophrénie <sup>109</sup>. Les neurostéroïdes comme l'allopregnanolone jouent également un rôle dans l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénergique (HPA). Ce métabolite de la progestérone régule l'inhibition des récepteurs GABA<sub>A</sub> impliqués dans de nombreuses maladies psychiatriques <sup>110</sup>. Les concentrations d'allopregnanolone sont altérées dans plusieurs régions cérébrales chez les patients schizophréniques et bipolaires <sup>111</sup>. Si les effets directs des perturbateurs endocriniens sur l'allopregnanolone n'ont pas été à ce jour directement étudiés, on peut les envisager à travers les modifications des taux ostrogéniques <sup>112</sup> et de progesterone <sup>113</sup>.

Anomalies de morphologie cérébrale : Les effets de l'exposition au bisphénol A sur le cervelet sont similaires aux anomalies retrouvées dans la schizophrénie <sup>114</sup>. Ils incluent une réduction de l'inhibition cérébelleuse, une taille des cellules de Purkinje réduite <sup>115</sup> une altération des systèmes de contrôle de la synaptogenèse <sup>116</sup>. Des similarités entre schizophrénie et exposition au bisphénol A ont été également mises en avant au niveau de la différenciation, de la migration et de l'apoptose neuronale <sup>117,118</sup>. Des modèles d'apoptose neuronale de la schizophrénie ont été proposés chez le rat traité en néonatal par acide kaïnique. L'étude de l'apoptose des hippocampaux étant réalisée par la méthode TUNEL (*transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) <sup>119</sup> Chez des rats exposés néonatalement au bisphénol A, le même profil TUNEL a pu être observé <sup>63</sup>. Les anomalies communes de la synaptogenèse retrouvées chez les patients schizophrènes et chez les exposés au bisphénol A pourraient être médiées par la cascade de la MAP (*mitogen-activated protein*) kinase, influant elle-même sur la densité synaptique des dendrites pyramidaux CA1 <sup>120,121</sup>. Au niveau de l'architecture neuronale plus générale, un profil similaire semble apparaître chez les patients schizophrènes et exposés au bisphénol A, caractérisé par une croissance neuronale majorée dans les cinquièmes et sixièmes couches corticales <sup>122,123</sup>. Des anomalies des cellules gliales semblent également apparaître dans les deux conditions <sup>124,125</sup>.

Anomalies des fonctions hormonales : Les récepteurs œstrogéniques semblent jouer un rôle dans de nombreuses affections neuropsychiatriques. Ainsi, l'expression du récepteur œstrogéniques  $\alpha$  paraît moindre dans l'amygdale, le cortex frontal et l'hippocampe de plusieurs affections psychiatriques, son taux d'ARNm étant abaissé <sup>126</sup>. Dans les modèles rongeurs, l'exposition néonatale et pubertaire au bisphénol A altère l'expression du récepteur  $\alpha$  <sup>127</sup> avec un dimorphisme sexuel. Les effets sur la progestérone sont moins décrits mais peuvent être envisagés, notamment, comme vu plus haut, à travers l'action de neurostéroïdes comme l'allopregnanolone. Un autre axe hormonal majeur altéré à la fois dans la schizophrénie et par certains perturbateurs endocriniens est l'axe LH/testostérone. Dans la schizophrénie, des taux basal abaissé de LH ont été retrouvés sans qu'ils ne soient forcément associés à une hyperprolactinémie <sup>128</sup>. L'exposition au bisphénol A se traduit également par un taux abaissé de LH, de testostérone ainsi que de  $17\alpha$ -hydroxylase chez le rat <sup>129</sup>.

Anomalies des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs : Une relation nette a été montrée entre schizophrénie et surexpression dopaminergique via le récepteur D2, la

fonction du récepteur D1A paraissant également altérée <sup>130</sup>. Chez la souris exposée au bisphénol A, à J5, on observe une surexpression du gène du récepteur D2 <sup>131</sup>. Les observations faites sur la tyrosine hydroxylase (TH) semblent également s'accorder. La TH est un marqueur des cellules synthétisant de la dopamine, sa transcription est augmentée chez les patients schizophrènes <sup>132</sup>. Des modèles de souris schizophrènes présentant une diminution de la densité et de la longueur des neurones TH ont été proposés <sup>133</sup>, paradoxalement les taux de dopamine observés restaient élevés. Chez des souris exposées in utero au bisphénol A, le dimorphisme des neurones TH apparaît diminué, avec notamment une diminution du nombre de ces neurones chez la femelle <sup>134</sup>, nombre restant stable chez le mâle <sup>135</sup>. La acétylcholine transférase est abaissée dans le nucleus accumbens de patients schizophrènes ce qui pu être corrélé à certains troubles cognitifs <sup>136</sup>. Suite à une exposition au bisphénol A, ont été retrouvés ces mêmes troubles associés à une diminution du taux de acétylcholine transférase dans l'hippocampe <sup>137</sup>.

*Anomalies des protéines et facteurs :* Sonic Hedgog (SH) est une molécule de signalisation et un facteur impliqué dans le développement des neurones dopaminergiques. L'altération de la voie de SH est retrouvée dans des pathologies neurodéveloppementales et notamment dans l'holoprosencéphalie (HPE) <sup>138</sup> pour laquelle les modèles animaux retrouvent plusieurs caractéristiques de la schizophrénie <sup>139</sup>. L'exposition prénatale au bisphénol A induit également des déficits de la voie de SH <sup>140</sup>. Le GDNF (*Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor*) pourrait jouer un rôle dans la schizophrénie du fait que certains allèles de ce gène constitueraient des facteurs protecteurs de la maladie <sup>141</sup>. L'exposition au Bisphénol A diminue les taux de GDNF. De même, des similitudes d'altération des taux de galanine (qui module la transmission sérotoninergique et inhibe la transmission dopaminergique) ont été retrouvés dans la schizophrénie et après exposition au bisphénol A <sup>142,143</sup>.

### 3. Etudes épigénétiques

En dehors du mécanisme « classique » de liaison des perturbateurs endocriniens à certains récepteurs cellulaires d'intérêt, des modifications épigénétiques ont été avancées comme conséquence à l'exposition. En effet, la vaste majorité des perturbateurs endocriniens n'ont pas la capacité d'altérer la séquence d'ADN ou de promouvoir des mutations génétiques<sup>144</sup>. L'environnement peut cependant influencer les processus épigénétiques pour altérer l'expression génique et le développement.

A ce jour, l'étude des conséquences épigénétiques liées aux perturbateurs endocriniens a principalement été conduite par des approches de gènes candidats. Sur des cellules épithéliales de sein humain, l'exposition au bisphénol A induit une hyperméthylation de gènes spécifiques (*BCL2L11*, *PARD6G*, *FOXP1* et *SFRS11*), ainsi qu'une hypométhylation de *NUP98* et de *CtIP* (*RBBP8*)<sup>145</sup>. Sur des souris CD1, l'exposition in utero au bisphénol A induit une hypométhylation du promoteur et d'un intron de *HOXA10*, un gène contrôlant l'organogenèse utérine<sup>146</sup>. Chez le rat mâle, l'exposition au bisphénol A régule négativement l'expression des ADN méthyltransférases (DNMT) qui sont impliquées dans la machinerie de la méthylation de l'ADN<sup>147</sup>. Au moyen de *Restriction Landmark Genomic Scanning* (RLGS) et d'une PCR quantitative sensible à la méthylation, Yaoi et al. ont examiné le statut de méthylation de 2500 CpG de cerveau de fœtus de souris après exposition à des faibles doses de bisphénol A. Des modifications du signal d'intensité ont été retrouvées sur 48 spots (1,9%) entre les groupes exposés et non-exposés, indiquant des changements de niveaux de méthylation<sup>148</sup>. Cette technique d'approche sur génome entier reste néanmoins limitée par un taux de couverture relativement faible. Kim et al. ont récemment publié la première étude de méthylation de l'ADN sur génome entier, appliquée à des cellules hépatiques de souris après exposition au bisphénol A durant la gestation et la lactation<sup>149</sup>. En utilisant une méthode de séquençage de nouvelle génération appliquée à la méthylation (*MethylPlex-Next Generation Sequencing*, utilisation d'enzymes de restriction dépendantes de l'état de méthylation avant

d'effectuer un *deep-sequencing*), plusieurs gènes impliqués dans des voies de signalisation spécifiques (transport transmembranaires de petites molécules, métabolisme, réponse au stimulus, synapse glutamatergique et régulation de l'autophagie) ont été identifiés comme différemment méthylés.

Plusieurs études ont étudié les perturbations épigénétiques liées à l'exposition au diethylstilbestrol en utilisant des approches de gènes candidats sur des modèles animaux<sup>150-153</sup>. L'exposition in utero au diethylstilbestrol a été associée à des modifications d'expression de DNMT1 dans plusieurs tissus comme l'épididyme<sup>152</sup> ou l'utérus<sup>154</sup>. Bromer et al. ont étudié le statut de méthylation de l'*homeobox A10 (HOXA10)* sur des cellules endométriales humaines. Une hyperméthylation d'*HOXA10* a été observée dans la partie caudale de l'utérus après exposition<sup>151</sup>. Des résultats similaires ont été observés pour les gènes *c-fox* et *Nsbp1*<sup>153,155</sup>. A notre connaissance toutefois, concernant l'exposition au diethylstilbestrol, ce projet est le premier utilisant une technique d'étude sur le génome entier humain.

Nous n'avons pas observé que l'exposition au diethylstilbestrol induisait des modifications de méthylation globale sur l'ensemble du génome. En revanche nous avons observé des modifications de méthylation de CpG spécifiques participant à plusieurs réseaux biologiques.

L'utilisation de *ConsensusPathDB* nous a permis d'identifier 29 réseaux auquel nos top100 CpG sont significativement susceptibles de participer (q-value < 0.05). Douze de ces réseaux sont impliqués dans des fonctions neurodéveloppementales. Les différentes synapses pour chaque neurotransmetteur (GABA, acétylcholine, dopamine, sérotonine et glutamate) sont notamment retrouvées.

Trois réseaux sont impliqués dans des voies d'oncogenèse : la protéine BCR (*breakpoint cluster region*) a elle-même été impliquée dans la régulation du développement neuronal par le contrôle par PTPRT (*Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T*) du domaine d'activation de la BCR-GTPase<sup>156</sup>. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) a été également impliquée dans la régulation du neurodéveloppement<sup>157</sup>. Pour rappel, l'exposition in utero au diethylstilbestrol a montré un risque cumulé par comparaison à la non-exposition de : 6.9% vs. 3.4% (hazard ratio = 2.28 ; IC 95% [1.59 - 3.27]) pour le cancer du col de l'utérus de grade 2 ou supérieur ; et de 3.9% vs. 2.2% (hazard ratio = 1.82 ; IC 95% [1.04 - 3.18]) pour le cancer du sein à partir de 40 ans.

Six réseaux sont impliqués dans des processus plus « généraux » comme le réseau de signalisation du calcium, particulièrement important pour la transmission du signal de dépolarisation et de l'activité synaptique <sup>158</sup>.

Plusieurs gènes acteurs de réseaux biologiquement significatifs apparaissent donc différemment méthylés après une exposition in utero au diethylstilbestrol. Plusieurs hypothèses physiopathologiques pourraient expliquer ce changement du profil de méthylation.

Selon le modèle de la « signature », l'exposition au diethylstilbestrol laisserait une signature méthylomique dans le sang, sans qu'il n'y ait réellement de relations de cause à effet avec la méthylation cérébrale et/ou l'apparition de la maladie. Le diethylstilbestrol pourrait agir sur l'émergence de la maladie par un mécanisme hormonal notamment. La signature dans le sang pourrait être alors conçue comme possible biomarqueur de l'exposition au diethylstilbestrol et de l'apparition de troubles neurodéveloppementaux.

Le modèle du « site en miroir fonctionnel » fait l'hypothèse d'un rôle causal entre méthylation dans le cerveau et apparition de la maladie. Un mécanisme toxique (neurotoxique notamment) direct du diethylstilbestrol pourrait entraîner secondairement des modifications de la méthylation comme réaction à la lésion. Les modifications de méthylation dans le sang apparaîtraient en miroir de celles présentes dans le cerveau. En effet plusieurs études sont en faveur d'une concordance relative entre les profils de méthylation dans le sang et dans le cerveau <sup>159 160</sup>, bien que l'amplitude des niveaux de méthylation périphériques pourrait être inférieure par rapport aux tissus centraux <sup>161</sup>.

Etudiant les conséquences épigénétiques de l'exposition au diethylstilbestrol avec une approche gène candidat, Li et al. A ont observé une déméthylation du promoteur de la lactoferrine <sup>162</sup>. De façon intéressante, cette déméthylation n'a pas été observée chez les souris exposées ayant été au préalable ovariectomisées, soulignant un effet hormonal du diethylstilbestrol sur la méthylation de promoteurs spécifiques.

En dehors des effets possibles de l'exposition au diethylstilbestrol sur la méthylation de l'ADN, d'autres mécanismes épigénétiques liés à l'exposition ont pu être évoqués. Banh et al. ont récemment mis en évidence une augmentation de l'expression d'une histone

methyltransférase (EZH2) suite à l'exposition à certains perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A ou le diethylstilbestrol <sup>163</sup>.

L'exposition maternelle au diethylstilbestrol a également été associée à des modifications persistantes d'expression de miARN chez la descendance. Suite à l'exposition in utero à l'éthynil-estradiol, une diminution de plusieurs miARN a été constaté dans la glande mammaire <sup>164</sup>

Ces différents mécanismes épigénétiques pourraient tout à fait s'intriquer. En effet les miARN peuvent être inhibé par la méthylation <sup>165,166</sup> et ciblent eux-même les ADN méthyltransférases et les histones déacétylases <sup>167</sup>.

#### **4. Perspectives de recherche**

Les conséquences de l'exposition, prénatale notamment, aux perturbateurs endocriniens sont sujettes à beaucoup de réflexions et de préoccupations actuelles. Le sujet est aujourd'hui fréquemment abordé par les médias « généralistes » et a été l'objet de lois récentes visant à limiter leur utilisation. La littérature scientifique se multiplie de façon exponentielle, pour être en mesure d'affirmer des conséquences diverses sur la santé des individus exposés. Le sujet demeure extrêmement vaste et la généralisation ardue, notamment dans le domaine des conséquences psychiatriques de l'exposition.

L'étude de l'exposition *per se* est une première difficulté. Dans le cas du diethylstilbestrol, produit artificiel administré par le passé sur prescription médicale, il est relativement aisé de déterminer si une personne a été exposée ou non. Il peut être plus délicat de déterminer précisément le moment et la dose de prise, du fait de l'ancienneté des prises. Cet exemple permet de comparer une population exposée à une population non-exposée « pure ». D'autres événements ponctuels similaires ont eu lieu (exemple des garçons Yu-Cheng, exposés au PCB entre 1978 et 1979, précédemment cité) et permettent d'avancer dans notre réflexion. Toutefois, si ces événements nous laissent envisager des possibles voies physiopathologiques, nous

permettent-ils vraiment de faire un parallèle avec les doses beaucoup plus faibles des perturbateurs endocriniens retrouvés aujourd'hui communément dans notre environnement?

En effet, dans le cas de la majorité des perturbateurs endocriniens, l'exposition est ubiquitaire. Ainsi, la possibilité de témoins « sains » n'est pas envisageable, d'où la nécessité de quantifier l'exposition (mesure sanguine ou urinaire) avec souvent des marges d'erreur et des effets-doses retrouvés. Par ailleurs, nous avons vu qu'un nombre important de perturbateurs endocriniens a été décrit à ce jour. Pouvons-nous vraiment généraliser les conséquences d'un produit à l'ensemble des perturbateurs endocriniens ? Peut-on seulement généraliser les résultats à un groupe ?

L'utilisation de modèles animaux est un moyen de contrôler l'exposition et d'avancer sur les conséquences moléculaires de l'exposition. La difficulté de réaliser des modèles phénotypiques calqués sur les principales maladies psychiatriques humaines reste une véritable limite toutefois.

L'assomption d'un postulat « exposition aux perturbateurs endocriniens = schizophrénie, trouble de l'humeur... » paraît restreinte et trop peu étayée sur le plan scientifique. L'étude réalisée, ainsi que la littérature disponible, nous amènent toutefois à penser que l'exposition à différents facteurs, par la dérégulation de plusieurs voies biologiques, pourrait mener à des phénotypes psychiatriques divers, pour certains assimilables aux catégories diagnostiques définies par le DSM, pour d'autres plus complexes. Nous savons aujourd'hui que les maladies psychiatriques, au sein de chaque catégorie diagnostique, restent très hétérogènes. Si ces catégories reposent sur des mécanismes physiopathologiques sous-jacents communs, il semble que plusieurs voies biologiques peuvent amener à un même phénotype, ou qu'une voie biologique unique puisse être à l'origine de différents phénotypes. Dans cette optique, l'exposition aux perturbateurs endocriniens serait amenée à déréguler plusieurs voies biologiques. Leurs combinaisons pourraient favoriser l'émergence de phénotypes multiples, que nous regroupons ici sous le terme de « pathologies neurodéveloppementales ». C'est ici toute la complexité des maladies multifactorielles, résultant d'interactions « gène X environnement », difficiles à étudier et dont les combinaisons paraissent parfois infinies.

Comment aller plus loin ? En gardant une attitude scientifique d'abord. En répliquant nos résultats à d'autres perturbateurs endocriniens d'action similaire d'une part, en confirmant les voies biologiques chez l'animal d'autre part. L'utilisation de techniques de sé-

quénage plus récentes, ainsi que le corolaire à l'expression de l'ARN et des protéines, aiderait également à mieux définir les mécanismes biologiques suspectés. Enfin, sur le plan clinique, l'enjeu est de pouvoir extrapoler ces résultats à notre pratique médicale. Nos conclusions invitent à penser que la dérégulation menant aux phénotypes psychiatriques peut avoir lieu au tout début de la vie embryonnaire. Insister auprès des patients sur les événements anamnestiques précoces paraît capital, tout comme détecter les anomalies neurodéveloppementales dès la petite enfance.

## **5. Limites**

### Biais de confusion

Sur le plan du phénotype clinique, un biais de confusion potentiel repose dans le fait que l'exposition prénatale au diéthylstilbestrol peut amener à des complications obstétricales, représentant elles-mêmes un possible facteur de risque environnemental à des troubles psychiatriques à l'âge adulte. Concernant les données de méthylation, les patients exposés présentaient davantage de malformations urogénitales, nous n'avons pas contrôlé nos résultats sur ce critère. Au moment de l'inclusion toutefois, aucun patient inclus ne présentait de cancer diagnostiqué.

### Biais de sélection

Le biais de sélection est un véritable questionnement dans les cohortes de patients exposés au diéthylstilbestrol. Il apparaît en cas de différence significative entre les patients exposés inclus dans l'étude et les exposés de la population générale. Par exemple quand plus de patients exposés et malades sont inclus que de patients exposés non malades. Ainsi, les patients atteints exposés et malades pourraient être plus à même d'intégrer une étude cas-témoins pour obtenir, à terme, une compensation légale par exemple. Ce biais limite l'interprétation des données phénotypiques. Néanmoins l'étude de méthylation, en assumant que celle-ci n'influence pas la participation ne semble pas soumise à ce biais.

### Nature de l'échantillon

Les études réalisées sur des échantillons sanguins posent de leur côté la question des possibilités d'interprétation des résultats, les neurones faisant partie des cellules les plus différenciées de l'organisme. Bien que nous admettions la spécificité tissulaire de la régulation épigénétique, la précocité et la sévérité de l'exposition prénatale au diethylstilbestrol dans notre cohorte rendraient la dysrégulation épigénétique du méthylome plus générale, et donc moins sélective au système nerveux.

### Technique utilisée

L'utilisation d'une puce de méthylation étudiant plus de 450 000 CpGs répartis sur l'ensemble du génome reste aujourd'hui moins performante en terme de couverture en comparaison aux techniques plus onéreuses de séquençage.

Malgré ces limitations, cette étude a plusieurs intérêts. A notre connaissance, il s'agit de la plus large approche sur génome entier concernant l'étude de l'exposition prénatale au diethylstilbestrol. Nous avons utilisé des réseaux afin de mieux apercevoir les conséquences fonctionnelles des modifications de méthylation.

Plusieurs aspects restent néanmoins à considérer dans de futures études.

La reproductibilité des résultats est un point important. L'utilisation d'une deuxième population permettrait d'estimer si la signature de nos meilleurs résultats est reproductible. Les cohortes de patients exposés au diethylstilbestrol sont cependant aujourd'hui mal recensées et mal documentées. Nous pourrions faire appel à des cohortes de deuxième ou troisième générations.

L'étude de l'expression des gènes différentiellement méthylés retrouvés dans notre étude pourrait également être une prochaine étape dans l'analyse et la compréhension de nos données.

## 6. Troisième génération

Les études autour du diethylstilbestrol s'intéressent aujourd'hui à la « troisième génération Distilbène® ». Il s'agit de préciser de possibles effets transgénérationnels dans les suites d'une exposition unique. Dans le cas du diethylstilbestrol, des conséquences sur les petits-enfants de la femme ayant pris la molécule durant sa grossesse.

La confirmation d'une action transgénérationnelle du diethylstilbestrol est cruciale ; non seulement d'un point de vue de santé publique, mais également dans la compréhension du mécanisme d'action de la molécule.

Plusieurs études animales ont retrouvé une majoration du risque de tumeurs dans la descendance de souris exposées au diethylstilbestrol in utero <sup>168-170</sup>.

Ces dernières ont également permis d'étudier les effets du diethylstilbestrol dans des études multigénérationnelles. Les progénitures de souris exposées in utero au diethylstilbestrol ont vu leur risque de développer des cancers utérins, du rete testis et des vésicules séminales majorés <sup>170,171</sup>. L'exposition au diethylstilbestrol induit également des malformations des organes génitaux externes chez la troisième génération de souris exposées <sup>172</sup>.

Dans l'une des premières études s'intéressant à cette troisième génération, Klip et al. ont retrouvé une majoration du risque d'hypospadias chez les fils de femmes exposées in utero au diethylstilbestrol (ratio de prévalence 21.3, IC 95% 6.5-70.1) <sup>173</sup>. En 2006, ce risque d'hypospadias a été confirmé par Brouwers et al. avec une magnitude néanmoins plus faible <sup>174</sup>. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette majoration de risque. Tout d'abord la possibilité d'une malformation de l'appareil reproducteur pouvant interférer avec un développement fœtal normal durant la grossesse. Une autre hypothèse serait celle d'un équilibre hormonal perturbé durant l'âge adulte des filles exposées au diethylstilbestrol. Enfin, une dernière possibilité serait celle d'une perturbation génétique ou épigénétique transmise.

Chez les filles de femmes exposées in utero ont été observés des cycles irréguliers et un début de règles plus tardif <sup>175</sup>.

A ce jour, une majoration du risque de tumeurs bénignes ou malignes chez la troisième génération n'a pas été observée. De façon isolée, l'incidence de cancer ovarien

a été toutefois supérieure à celle de la population générale chez les filles de femmes exposées in utero <sup>176</sup>.

Les mécanismes épigénétiques sont compatibles avec ces effets transgénérationnels. En effet, les fréquences ne baissent pas à chaque génération mais restent élevées, suggérant des mécanismes non mendéliens. En considérant les phénomènes transgénérationnels, il est essentiel de distinguer des effets dus à une exposition directe multigénérationnelle et des effets transmis par la lignée germinale. L'exposition d'une génération F0 enceinte peut expliquer des effets sur les générations F1 et F2, mais l'analyse de la génération F3 permet d'observer des marques épigénétiques en faveur d'une transmission par la lignée germinale (figure 19).

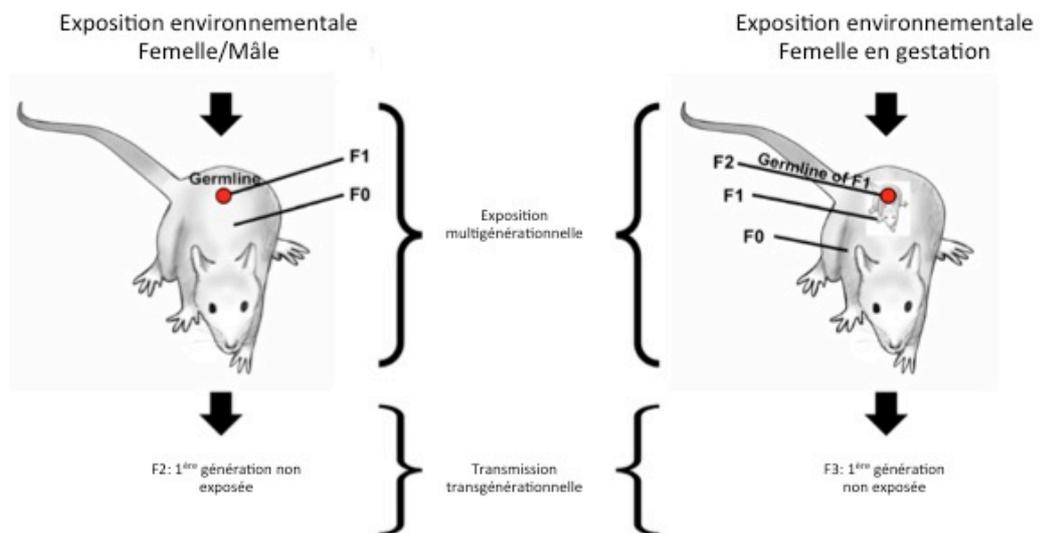


Figure 19. Exposition multigénérationnelle et transmission transgénérationnelle.

Les cellules germinales subissent deux phénomènes d'effacement épigénétique. D'abord, juste après la fertilisation, puis autour du dixième jour embryonnaire, aux stades de cellules prégerminales. Quand celles-ci migrent pour former les gonades, elles subissent alors une reprogrammation épigénétique spécifique avec un dimorphisme sexuel <sup>178</sup>. Ce phénomène de reprogrammation apparaît sensible à l'environnement, hormonal notamment.

L'exposition à ce stade à un perturbateur endocrinien pourrait donc laisser une empreinte définitive sur le génome de la génération F1, et être hérité par la lignée germinale de la génération F2 et suivantes. A titre d'exemple, les schémas de méthylation descendants de rongeurs exposés au vinclozoline ont été étudiés. A la génération F3, 43 gènes différenciellement méthylés étaient toujours retrouvés <sup>179</sup>. Les mécanismes sous-tendant ce phénomène d'« échappement » à la reprogrammation restent rares. Ils ont été principalement étudiés chez les plantes et certaines lignées animales comme les nématodes. Les données chez l'homme restent à ce jour très limitées <sup>180</sup>.

La transmission transgénérationnelle, par des mécanismes d'empreinte notamment, ainsi que la persistance d'expositions continues permettent d'expliquer l'augmentation d'incidence de certaines maladies et la majoration des effets à chaque génération <sup>181</sup>.

## CONCLUSION

Les législations européennes récentes (Conseil Européen 2009 – 2012) <sup>182</sup> qualifient les propriétés de perturbations endocrines comme incompatibles avec l'approbation de produits et de substances quels qu'ils soient. Toute substance ayant ce type de propriétés est en effet susceptible de causer des effets sur la santé humaine. De ce fait, elle ne peut être acceptée que si son exposition est négligeable. Toutefois, aucun critère scientifique n'a jusqu'alors été trouvé pour définir ces propriétés de perturbations endocrines. La régulation de ces substances est ainsi associée à plusieurs défis de taille.

Comme nous l'avons vu, le système endocrinien est complexe. Il entre en jeu dans toutes les fonctions des organismes vertébrés. Ces fonctions ne se résument pas au système reproductif, mais incluent les systèmes thyroïdien, surrénalien ou pancréatique notamment. Ainsi, tout effet toxique observé peut être, en théorie, lié au système endocrinien. Par ailleurs, les mécanismes sous-jacents aux effets toxiques observés sont complexes et difficilement reliables à une perturbation endocrine.

L'approche de la toxicologie réglementaire autour d'une relation dose effet est ici remise en question, du fait de l'absence de dose-effet pour un grand nombre de perturbateurs endocriniens.

La multiplicité des perturbateurs endocriniens dans notre environnement est responsable d'un effet « cocktail », rendant difficile l'analyse des différentes molécules de façon unique et indépendante.

En France, les décisions récentes prises autour de l'interdiction du bisphénol A reflètent la prise de conscience de la société de l'effort scientifique, et de la mobilisation des associations, argumentant des dangers de cette substance. Compte tenu des travaux publiés jusqu'à présent, il appartient maintenant à la société de faire la balance entre les bénéfices apportés par ces substances et l'impact sanitaire suspecté.

Nous avons étudié un perturbateur endocrinien parmi beaucoup d'autres : le diethylstilbestrol. Nous avons retrouvés des profils neuropsychologiques différents entre ex-

posés et non-exposés. Cette étude est également une première étape dans l'identification de la signature épigénétique à son exposition prénatale. Nos résultats indiquent que, plutôt que d'être associée à des changements globaux de méthylation, l'exposition prénatale au diethylstilbestrol est associée à des modifications de méthylation spécifiques. Ces altérations s'observent au niveau de gènes impliqués dans des voies biologiques potentiellement responsables de l'émergence des troubles psychiatriques.

Ces nouvelles observations aident à entrevoir les processus biologiques sous-tendant l'exposition précoce aux perturbateurs endocriniens et les conséquences possibles sur le neurodéveloppement.

Plusieurs aspects restent à envisager. Nos résultats bénéficieraient, d'une part, d'une réplification dans une autre population humaine, d'autre part, d'une confirmation à l'aide de modèles animaux. Par ailleurs, l'étude de l'ARN et de l'expression génique permettrait une meilleure appréhension de nos résultats, au niveau cellulaire. Cet effort reste en effet essentiel afin de mieux saisir les liens entre les données épigénétiques et cliniques observées dans notre étude.

## ANNEXE 1. Échelle BPRS

### Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS)

Individual's name:

Date:

Rater's name:

#### INSTRUCTIONS

This form consists of 24 symptom constructs, each to be rated on a 7-point scale of severity ranging from 'not present' to 'extremely severe'. If a specific symptom is not rated, mark 'NA' (not assessed). Circle the number headed by the term that best describes the patients present condition.

1	2	3	4	5	6	7
not present	very mild	mild	moderate	moderately severe	severe	extremely severe

1.	Somatic concern	NA	1	2	3	4	5	6	7
2.	Anxiety	NA	1	2	3	4	5	6	7
3.	Depression	NA	1	2	3	4	5	6	7
4.	Suicidality	NA	1	2	3	4	5	6	7
5.	Guilt	NA	1	2	3	4	5	6	7
6.	Hostility	NA	1	2	3	4	5	6	7
7.	Elated mood	NA	1	2	3	4	5	6	7
8.	Grandiosity	NA	1	2	3	4	5	6	7
9.	Suspiciousness	NA	1	2	3	4	5	6	7
10.	Hallucinations	NA	1	2	3	4	5	6	7
11.	Unusual thought content	NA	1	2	3	4	5	6	7
12.	Bizarre behavior	NA	1	2	3	4	5	6	7
13.	Self-neglect	NA	1	2	3	4	5	6	7
14.	Disorientation	NA	1	2	3	4	5	6	7
15.	Conceptual disorganization	NA	1	2	3	4	5	6	7
16.	Blunted affect	NA	1	2	3	4	5	6	7
17.	Emotional withdrawal	NA	1	2	3	4	5	6	7
18.	Motor retardation	NA	1	2	3	4	5	6	7
19.	Tension	NA	1	2	3	4	5	6	7
20.	Uncooperativeness	NA	1	2	3	4	5	6	7
21.	Excitement	NA	1	2	3	4	5	6	7
22.	Distractibility	NA	1	2	3	4	5	6	7
23.	Motor hyperactivity	NA	1	2	3	4	5	6	7
24.	Mannerisms and posturing	NA	1	2	3	4	5	6	7

## BIBLIOGRAPHIE

1. Statement from the work session on chemically-induced alterations in the developing immune system: the wildlife/human connection. *Environ. Health Perspect.* **104 Suppl 4**, 807–808 (1996).
2. Vested, A. *et al.* Associations of in utero exposure to perfluorinated alkyl acids with human semen quality and reproductive hormones in adult men. *Environ. Health Perspect.* **121**, 453–458, 458e1–5 (2013).
3. Cocuzza, M. & Esteves, S. C. Shedding light on the controversy surrounding the temporal decline in human sperm counts: a systematic review. *ScientificWorldJournal* **2014**, 365691 (2014).
4. Meeker, J. D. *et al.* Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **30**, 532–539 (2010).
5. N'Tumba-Byn, T. *et al.* Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PloS One* **7**, e51579 (2012).
6. Crain, D. A. *et al.* Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil. Steril.* **90**, 911–940 (2008).
7. Denham, M. *et al.* Relationship of lead, mercury, mirex, dichlorodiphenyldichloroethylene, hexachlorobenzene, and polychlorinated biphenyls to timing of menarche among Akwesasne Mohawk girls. *Pediatrics* **115**, e127–134 (2005).
8. Ottinger, M. A. *et al.* An overview of dioxin-like compounds, PCB, and pesticide exposures associated with sexual differentiation of neuroendocrine systems, fluctuating asymmetry, and behavioral effects in birds. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **27**, 286–300 (2009).
9. Fusani, L., Della Seta, D., Dessi-Fulgheri, F. & Farabollini, F. Altered reproductive success in rat pairs after environmental-like exposure to xenoestrogen. *Proc. Biol. Sci.* **274**, 1631–1636 (2007).
10. Cabaton, N. J. *et al.* Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* **121**, 586–593 (2013).
11. Mackay, H. *et al.* Organizational effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on arcuate nucleus circuitry controlling food intake and energy expenditure in male and female CD-1 mice. *Endocrinology* **154**, 1465–1475 (2013).
12. Rogers, J. A., Metz, L. & Yong, V. W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* **53**, 421–430 (2013).
13. Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Kappler, J. W. & Marrack, P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **9**, 494–498 (2010).
14. Phiel, K. L., Henderson, R. A., Adelman, S. J. & Elloso, M. M. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol. Lett.* **97**, 107–113 (2005).
15. Cunningham, M. & Gilkeson, G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **40**, 66–73 (2011).
16. Frericks, M., Meissner, M. & Esser, C. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220**, 320–332 (2007).
17. Glass, C. K. & Saijo, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 365–376

(2010).

18. Hugla, J. L. & Thomé, J. P. Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the barbel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **42**, 265–273 (1999).
19. Diethylstilboestrol and diethylstilboestrol dipropionate. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.* **21**, 173–231 (1979).
20. Smith, O. W. Diethylstilbestrol in the prevention and treatment of complications of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **56**, 821–834 (1948).
21. Smith, O. W. & Smith, G. V. S. The influence of diethylstilbestrol on the progress and outcome of pregnancy as based on a comparison of treated with untreated primigravidas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **58**, 994–1009 (1949).
22. Bittner, J. J. Possible Relationship of the Estrogenic Hormones, Genetic Susceptibility, and Milk Influence in the Production of Mammary Cancer in Mice. *Cancer Res.* **2**, 710–721 (1942).
23. Dieckmann, W. J., Davis, M. E., Rynkiewicz, L. M. & Pottinger, R. E. Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? *Am. J. Obstet. Gynecol.* **66**, 1062–1081 (1953).
24. Spira, A. *et al.* [Administration of diethylstilbestrol during pregnancy, a public health problem]. *Rev. Dépidémiologie Santé Publique* **31**, 249–272 (1983).
25. Herbst, A. L., Ulfelder, H. & Poskanzer, D. C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N. Engl. J. Med.* **284**, 878–881 (1971).
26. Hoover, R. N. *et al.* Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1304–1314 (2011).
27. Vessey, M. P., Fairweather, D. V., Norman-Smith, B. & Buckley, J. A randomized double-blind controlled trial of the value of stilboestrol therapy in pregnancy: long-term follow-up of mothers and their offspring. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **90**, 1007–1017 (1983).
28. Meyer-Bahlburg, H. F. *et al.* Depression in adults with a history of prenatal DES exposure. *Psychopharmacol. Bull.* **21**, 686–689 (1985).
29. Ehrhardt, A. A. *et al.* Psychopathology in prenatally DES-exposed females: current and lifetime adjustment. *Psychosom. Med.* **49**, 183–196 (1987).
30. Pillard, R. C. *et al.* Psychopathology and social functioning in men prenatally exposed to diethylstilbestrol (DES). *Psychosom. Med.* **55**, 485–491 (1993).
31. Fried-Cassorla, M., Scholl, T. O., Borow, L. D., Strassman, H. D. & Bowers, E. J. Depression and diethylstilbestrol exposure in women. *J. Reprod. Med.* **32**, 847–850 (1987).
32. Gustavson, C. R. *et al.* Increased risk of profound weight loss among women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Behav. Neural Biol.* **55**, 307–312 (1991).
33. Titus-Ernstoff, L. *et al.* Psychosexual characteristics of men and women exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Epidemiol. Camb. Mass* **14**, 155–160 (2003).
34. O'Reilly, E. J., Mirzaei, F., Forman, M. R. & Ascherio, A. Diethylstilbestrol exposure in utero and depression in women. *Am. J. Epidemiol.* **171**, 876–882 (2010).
35. Katz, D. L., Frankenburg, F. R., Benowitz, L. I. & Gilbert, J. M. Psychosis and prenatal exposure to diethylstilbestrol. *J. Nerv. Ment. Dis.* **175**, 306–308 (1987).
36. Tsuang, M. T., Winokur, G. & Crowe, R. R. Morbidity risks of schizophrenia and affective disorders among first degree relatives of patients with schizophrenia, mania, depression and surgical conditions. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **137**, 497–504 (1980).
37. Vallès, V. *et al.* Increased morbid risk for schizophrenia in families of in-patients with bipolar illness. *Schizophr. Res.* **42**, 83–90 (2000).
38. Morimoto, L. M., White, E. & Newcomb, P. A. Selection bias in the assessment of gene-environment interaction in case-control studies. *Am. J. Epidemiol.* **158**,

259–263 (2003).

39. Grayson, D. R., Chen, Y., Dong, E., Kundakovic, M. & Guidotti, A. From trans-methylation to cytosine methylation: evolution of the methylation hypothesis of schizophrenia. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* **4**, 144–149 (2009).
40. Toledo-Rodriguez, M. *et al.* Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* **153B**, 1350–1354 (2010).
41. Hatch, E. E. *et al.* Cancer risk in women exposed to diethylstilbestrol in utero. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **280**, 630–634 (1998).
42. Strohsnitter, W. C. *et al.* Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 545–551 (2001).
43. Palmer, J. R. *et al.* Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **15**, 1509–1514 (2006).
44. Warita, K. *et al.* Microarray and gene ontology analyses reveal downregulation of DNA repair and apoptotic pathways in diethylstilbestrol-exposed testicular Leydig cells. *J. Toxicol. Sci.* **37**, 287–295 (2012).
45. Rowas, S. A. *et al.* Effect of in utero exposure to diethylstilbestrol on lumbar and femoral bone, articular cartilage, and the intervertebral disc in male and female adult mice progeny with and without swimming exercise. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R17 (2012).
46. Haddad, R., Kasneci, A., Mephram, K., Sebag, I. A. & Chalifour, L. E. Gestational exposure to diethylstilbestrol alters cardiac structure/function, protein expression and DNA methylation in adult male mice progeny. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **266**, 27–37 (2013).
47. Yin, Y. *et al.* Neonatal diethylstilbestrol exposure alters the metabolic profile of uterine epithelial cells. *Dis. Model. Mech.* **5**, 870–880 (2012).
48. Strohsnitter, W. C. *et al.* Autoimmune disease incidence among women prenatally exposed to diethylstilbestrol. *J. Rheumatol.* **37**, 2167–2173 (2010).
49. Saeed, A. I. *et al.* TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**, 374–378 (2003).
50. Petronis, A. Epigenetics and twins: three variations on the theme. *Trends Genet. TIG* **22**, 347–350 (2006).
51. Slotkin, T. A. & Seidler, F. J. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res. Bull.* **72**, 232–274 (2007).
52. Tiwari, S. K., Agarwal, S., Chauhan, L. K. S., Mishra, V. N. & Chaturvedi, R. K. Bisphenol-A Impairs Myelination Potential During Development in the Hippocampus of the Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* (2014). doi:10.1007/s12035-014-8817-3
53. Guo, Y. L., Lai, T. J., Chen, S. J. & Hsu, C. C. Gender-related decrease in Raven's progressive matrices scores in children prenatally exposed to polychlorinated biphenyls and related contaminants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **55**, 8–13 (1995).
54. Schantz, S. L. & Widholm, J. J. Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environ. Health Perspect.* **109**, 1197–1206 (2001).
55. Corrieri, L., Della Seta, D., Canoine, V. & Fusani, L. Developmental exposure to xenoestrogen enhances spatial learning in male rats. *Horm. Behav.* **51**, 620–625 (2007).
56. Sadowski, R. N. *et al.* Effects of perinatal bisphenol A exposure during early development on radial arm maze behavior in adult male and female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **42**, 17–24 (2014).
57. Ricceri, L. *et al.* Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **191**,

189–201 (2003).

58. Ricceri, L. *et al.* Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **93**, 105–113 (2006).
59. Venerosi, A. *et al.* Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicol. Teratol.* **30**, 468–474 (2008).
60. Venerosi, A., Calamandrei, G. & Ricceri, L. A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* **28**, 466–471 (2006).
61. Palanza, P., Parmigiani, S., Liu, H. & vom Saal, F. S. Prenatal exposure to low doses of the estrogenic chemicals diethylstilbestrol and o,p'-DDT alters aggressive behavior of male and female house mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**, 665–672 (1999).
62. Tanaka, M., Ohtani-Kaneko, R., Yokosuka, M. & Watanabe, C. Low-dose perinatal diethylstilbestrol exposure affected behaviors and hypothalamic estrogen receptor-alpha-positive cells in the mouse. *Neurotoxicol. Teratol.* **26**, 261–269 (2004).
63. Ishido, M., Yonemoto, J. & Morita, M. Mesencephalic neurodegeneration in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicol. Lett.* **173**, 66–72 (2007).
64. Gioiosa, L., Fissore, E., Ghirardelli, G., Parmigiani, S. & Palanza, P. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* **52**, 307–316 (2007).
65. Ogi, H., Itoh, K. & Fushiki, S. Social behavior is perturbed in mice after exposure to bisphenol A: a novel assessment employing an IntelliCage. *Brain Behav.* **3**, 223–228 (2013).
66. Xu, X., Tian, D., Hong, X., Chen, L. & Xie, L. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology* **61**, 565–573 (2011).
67. Xu, X. *et al.* Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety- and depression-like behaviors in adult mice. *Chemosphere* **120C**, 258–266 (2014).
68. Hoffman, D. J., Eagles-Smith, C. A., Ackerman, J. T., Adelsbach, T. L. & Stebbins, K. R. Oxidative stress response of Forster's terns (*Sterna forsteri*) and Caspian terns (*Hydroprogne caspia*) to mercury and selenium bioaccumulation in liver, kidney, and brain. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* **30**, 920–929 (2011).
69. Stein, J., Schettler, T., Wallinga, D. & Valenti, M. In harm's way: toxic threats to child development. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* **23**, S13–22 (2002).
70. Winneke, G. Developmental aspects of environmental neurotoxicology: lessons from lead and polychlorinated biphenyls. *J. Neurol. Sci.* **308**, 9–15 (2011).
71. Martel, M. M., Klump, K., Nigg, J. T., Breedlove, S. M. & Sisk, C. L. Potential hormonal mechanisms of attention-deficit/hyperactivity disorder and major depressive disorder: a new perspective. *Horm. Behav.* **55**, 465–479 (2009).
72. Hwang, L. Environmental stressors and violence: lead and polychlorinated biphenyls. *Rev. Environ. Health* **22**, 313–328 (2007).
73. Braun, J. M. *et al.* Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1945–1952 (2009).
74. Liew, Z. *et al.* Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances and the Risk of Congenital Cerebral Palsy in Children. *Am. J. Epidemiol.* (2014). doi:10.1093/aje/kwu179
75. Hong, S.-B. *et al.* Bisphenol A in relation to behavior and learning of school-age children. *J. Child Psychol. Psychiatry* **54**, 890–899 (2013).
76. Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F. & Alarcón, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **256**, 379–385 (2011).
77. Darras, V. M. Endocrine disrupting polyhalogenated organic pollutants inter-

- ferre with thyroid hormone signalling in the developing brain. *Cerebellum Lond. Engl.* **7**, 26–37 (2008).
78. Gilbert, M. E., Rovet, J., Chen, Z. & Koibuchi, N. Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* **33**, 842–852 (2012).
79. Chen, F., Zhou, L., Bai, Y., Zhou, R. & Chen, L. Sex differences in the adult HPA axis and affective behaviors are altered by perinatal exposure to a low dose of bisphenol A. *Brain Res.* **1571**, 12–24 (2014).
80. Suzuki, T. *et al.* Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience* **117**, 639–644 (2003).
81. Chen, W.-Q. *et al.* Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology* **32**, 355–361 (2011).
82. Veenema, A. H. & Neumann, I. D. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog. Brain Res.* **170**, 261–276 (2008).
83. De Vries, G. J., Buijs, R. M. & Sluiter, A. A. Gonadal hormone actions on the morphology of the vasopressinergic innervation of the adult rat brain. *Brain Res.* **298**, 141–145 (1984).
84. Han, T. M. & De Vries, G. J. Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurobiol.* **54**, 502–510 (2003).
85. Kodavanti, P. R. S. & Curras-Collazo, M. C. Neuroendocrine actions of organohalogenes: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 479–496 (2010).
86. Roy, B. N., Reid, R. L. & Van Vugt, D. A. The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology* **140**, 2191–2198 (1999).
87. Scallet, A. C., Wofford, M., Meredith, J. C., Allaben, W. T. & Ferguson, S. A. Dietary exposure to genistein increases vasopressin but does not alter beta-endorphin in the rat hypothalamus. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **72**, 296–300 (2003).
88. Ferguson, J. N., Young, L. J. & Insel, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front. Neuroendocrinol.* **23**, 200–224 (2002).
89. Bale, T. L. & Dorsa, D. M. Sex differences in and effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the ventromedial hypothalamus. *Endocrinology* **136**, 27–32 (1995).
90. Sullivan, A. W. *et al.* A novel model for neuroendocrine toxicology: Neurobehavioral effects of BPA exposure in a prosocial species, the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Endocrinology* en20141379 (2014). doi:10.1210/en.2014-1379
91. Kumamoto, T. & Oshio, S. Effect of fetal exposure to bisphenol A on brain mediated by X-chromosome inactivation. *J. Toxicol. Sci.* **38**, 485–494 (2013).
92. Santos, D., Matos, M. & Coimbra, A. M. Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. *Neurotoxicol. Teratol.* **46C**, 18–25 (2014).
93. Xu, X. *et al.* Bisphenol A promotes dendritic morphogenesis of hippocampal neurons through estrogen receptor-mediated ERK1/2 signal pathway. *Chemosphere* **96**, 129–137 (2014).
94. Rebuli, M. E. *et al.* Investigation of the effects of subchronic low dose oral exposure to bisphenol A (BPA) and ethinyl estradiol (EE) on estrogen receptor ex-

- pression in the juvenile and adult female rat hypothalamus. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **140**, 190–203 (2014).
95. Mahawong, P. *et al.* Comparative effects of neonatal diethylstilbestrol on external genitalia development in adult males of two mouse strains with differential estrogen sensitivity. *Differ. Res. Biol. Divers.* **88**, 70–83 (2014).
  96. Tomihara, K. *et al.* Abolition of sex-dependent effects of prenatal exposure to diethylstilbestrol on emotional behavior in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Neuroreport* **17**, 1169–1173 (2006).
  97. Panzica, G. C. *et al.* Neuropeptides and enzymes are targets for the action of endocrine disrupting chemicals in the vertebrate brain. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **14**, 449–472 (2011).
  98. Marx, C. E. & Lieberman, J. A. Psychoneuroendocrinology of schizophrenia. *Psychiatr. Clin. North Am.* **21**, 413–434 (1998).
  99. Stevens, J. R. Schizophrenia: reproductive hormones and the brain. *Am. J. Psychiatry* **159**, 713–719 (2002).
  100. Koenig, J. I. *et al.* Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav. Brain Res.* **156**, 251–261 (2005).
  101. Goldstein, J. M. Sex, hormones and affective arousal circuitry dysfunction in schizophrenia. *Horm. Behav.* **50**, 612–622 (2006).
  102. North, K. & Golding, J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *BJU Int.* **85**, 107–113 (2000).
  103. Brown, A. S. *et al.* Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **61**, 774–780 (2004).
  104. Segal, M. *et al.* Prolactin and estradiol serum levels in unmedicated male paranoid schizophrenia patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**, 378–382 (2007).
  105. Hoff, A. L. *et al.* Association of estrogen levels with neuropsychological performance in women with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **158**, 1134–1139 (2001).
  106. Salokangas, R. K. R., Honkonen, T. & Saarinen, S. Women have later onset than men in schizophrenia—but only in its paranoid form. Results of the DSP project. *Eur. Psychiatry J. Assoc. Eur. Psychiatr.* **18**, 274–281 (2003).
  107. Conrad, C. D. *et al.* Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 8278–8285 (2007).
  108. Cerqueira, J. J. *et al.* Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 7792–7800 (2005).
  109. Ingram, N. *et al.* Interaction of corticosterone and nicotine in regulation of prepulse inhibition in mice. *Neuropharmacology* **48**, 80–92 (2005).
  110. Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M. A. & Smart, T. G. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**, 486–489 (2006).
  111. Marx, C. E. *et al.* Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **31**, 1249–1263 (2006).
  112. Frye, C. A. & Rhodes, M. E. Estrogen-priming can enhance progesterone's anti-seizure effects in part by increasing hippocampal levels of allopregnanolone. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **81**, 907–916 (2005).
  113. Bernardi, F. *et al.* Progesterone and medroxyprogesterone acetate effects on

- central and peripheral allopregnanolone and beta-endorphin levels. *Neuroendocrinology* **83**, 348–359 (2006).
114. Picard, H., Amado, I., Mouchet-Mages, S., Olié, J.-P. & Krebs, M.-O. The role of the cerebellum in schizophrenia: an update of clinical, cognitive, and functional evidences. *Schizophr. Bull.* **34**, 155–172 (2008).
115. Daskalakis, Z. J., Christensen, B. K., Fitzgerald, P. B., Fountain, S. I. & Chen, R. Reduced cerebellar inhibition in schizophrenia: a preliminary study. *Am. J. Psychiatry* **162**, 1203–1205 (2005).
116. Eastwood, S. L., Law, A. J., Everall, I. P. & Harrison, P. J. The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Mol. Psychiatry* **8**, 148–155 (2003).
117. Reif, A. *et al.* Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol. Psychiatry* **11**, 514–522 (2006).
118. Kim, K. *et al.* Suppressive effects of bisphenol A on the proliferation of neural progenitor cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* **70**, 1288–1295 (2007).
119. Humphrey, W. M., Dong, H., Csernansky, C. A. & Csernansky, J. G. Immediate and delayed hippocampal neuronal loss induced by kainic acid during early postnatal development in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **137**, 1–12 (2002).
120. Kyosseva, S. V. *et al.* Mitogen-activated protein kinases in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **46**, 689–696 (1999).
121. MacLusky, N. J., Hajszan, T. & Leranth, C. The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ. Health Perspect.* **113**, 675–679 (2005).
122. Chana, G., Landau, S., Beasley, C., Everall, I. P. & Cotter, D. Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol. Psychiatry* **53**, 1086–1098 (2003).
123. Nakamura, K., Itoh, K., Sugimoto, T. & Fushiki, S. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci. Lett.* **420**, 100–105 (2007).
124. Haroutunian, V. & Davis, K. L. Introduction to the special section: Myelin and oligodendrocyte abnormalities in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* **10**, 499–502 (2007).
125. Seiwa, C. *et al.* Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells. *Neuroendocrinology* **80**, 21–30 (2004).
126. Perlman, W. R. *et al.* Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biol. Psychiatry* **58**, 812–824 (2005).
127. Monje, L., Varayoud, J., Luque, E. H. & Ramos, J. G. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J. Endocrinol.* **194**, 201–212 (2007).
128. Ferrier, I. N., Johnstone, E. C., Crow, T. J. & Rincon-Rodriguez, I. Anterior pituitary hormone secretion in chronic schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry* **40**, 755–761 (1983).
129. Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R. & Hardy, M. P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* **145**, 592–603 (2004).
130. Miyamoto, S., Mailman, R. B., Lieberman, J. A. & Duncan, G. E. Blunted brain metabolic response to ketamine in mice lacking D(1A) dopamine receptors. *Brain Res.* **894**, 167–180 (2001).
131. Ishido, M., Morita, M., Oka, S. & Masuo, Y. Alteration of gene expression of

- G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regul. Pept.* **126**, 145–153 (2005).
132. Mueller, H. T., Haroutunian, V., Davis, K. L. & Meador-Woodruff, J. H. Expression of the ionotropic glutamate receptor subunits and NMDA receptor-associated intracellular proteins in the substantia nigra in schizophrenia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **121**, 60–69 (2004).
133. Klejbor, I. *et al.* Fibroblast growth factor receptor signaling affects development and function of dopamine neurons - inhibition results in a schizophrenia-like syndrome in transgenic mice. *J. Neurochem.* **97**, 1243–1258 (2006).
134. Rubin, B. S. *et al.* Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* **147**, 3681–3691 (2006).
135. Tando, S. *et al.* Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Dev.* **29**, 352–356 (2007).
136. Mancama, D., Mata, I., Kerwin, R. W. & Arranz, M. J. Choline acetyltransferase variants and their influence in schizophrenia and olanzapine response. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* **144B**, 849–853 (2007).
137. Miyagawa, K., Narita, M., Narita, M., Akama, H. & Suzuki, T. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A. *Neurosci. Lett.* **418**, 236–241 (2007).
138. Arsić, D., Beasley, S. W. & Sullivan, M. J. Switched-on Sonic hedgehog: a gene whose activity extends beyond fetal development--to oncogenesis. *J. Paediatr. Child Health* **43**, 421–423 (2007).
139. Ogura, H., Aruga, J. & Mikoshiba, K. Behavioral abnormalities of *Zic1* and *Zic2* mutant mice: implications as models for human neurological disorders. *Behav. Genet.* **31**, 317–324 (2001).
140. Miyagawa, K. *et al.* Changes in central dopaminergic systems with the expression of *Shh* or *GDNF* in mice perinatally exposed to bisphenol-A. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* **27**, 69–75 (2007).
141. Michelato, A. *et al.* 3' UTR (AGG)<sub>n</sub> repeat of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene polymorphism in schizophrenia. *Neurosci. Lett.* **357**, 235–237 (2004).
142. Kehr, J. *et al.* Galanin is a potent in vivo modulator of mesencephalic serotonergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **27**, 341–356 (2002).
143. Ericson, E. & Ahlenius, S. Suggestive evidence for inhibitory effects of galanin on mesolimbic dopaminergic neurotransmission. *Brain Res.* **822**, 200–209 (1999).
144. McCarrey, J. R. The epigenome as a target for heritable environmental disruptions of cellular function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **354**, 9–15 (2012).
145. Fernandez, S. V. *et al.* Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure. *Int. J. Oncol.* **41**, 369–377 (2012).
146. Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L. & Taylor, H. S. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 2273–2280 (2010).
147. Doshi, T., D'Souza, C., Dighe, V. & Vanage, G. Effect of neonatal exposure on male rats to bisphenol A on the expression of DNA methylation machinery in the postimplantation embryo. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **26**, 337–343 (2012).
148. Yaoi, T. *et al.* Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse fore-brain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 563–567 (2008).
149. Kim, J. H. *et al.* Perinatal bisphenol A exposure promotes dose-dependent

- alterations of the mouse methylome. *BMC Genomics* **15**, 30 (2014).
150. Li, Y. *et al.* Diethylstilbestrol (DES)-Stimulated Hormonal Toxicity is Mediated by ER $\alpha$  Alteration of Target Gene Methylation Patterns and Epigenetic Modifiers (DNMT3A, MBD2, and HDAC2) in the Mouse Seminal Vesicle. *Environ. Health Perspect.* **122**, 262–268 (2014).
  151. Bromer, J. G., Wu, J., Zhou, Y. & Taylor, H. S. Hypermethylation of homeobox A10 by in utero diethylstilbestrol exposure: an epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology* **150**, 3376–3382 (2009).
  152. Sato, K. *et al.* Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters the expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the epididymis of mice. *Endocr. J.* **53**, 331–337 (2006).
  153. Tang, W.-Y. *et al.* Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* **149**, 5922–5931 (2008).
  154. Sato, K. *et al.* Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the mouse uterus. *Endocr. J.* **56**, 131–139 (2009).
  155. Li, S. *et al.* Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. *Mol. Carcinog.* **38**, 78–84 (2003).
  156. Park, A.-R. *et al.* Regulation of dendritic arborization by BCR Rac1 GTPase-activating protein, a substrate of PTPRT. *J. Cell Sci.* **125**, 4518–4531 (2012).
  157. Li, S., Haigh, K., Haigh, J. J. & Vasudevan, A. Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 14809–14815 (2013).
  158. Brini, M., Cali, T., Ottolini, D. & Carafoli, E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* (2014). doi:10.1007/s00018-013-1550-7
  159. Masliah, E., Dumaop, W., Galasko, D. & Desplats, P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* **8**, 1030–1038 (2013).
  160. Kaminsky, Z. *et al.* A multi-tissue analysis identifies HLA complex group 9 gene methylation differences in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **17**, 728–740 (2012).
  161. Dempster, E. L. *et al.* Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4786–4796 (2011).
  162. Li, S. *et al.* Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer Res.* **57**, 4356–4359 (1997).
  163. Bhan, A. *et al.* Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *J. Mol. Biol.* **426**, 3426–3441 (2014).
  164. Hilakivi-Clarke, L. A. *et al.* Abstract 835: Elevated in utero estrogenic environment may increase later breast cancer risk by down-regulating miRNAs. *Cancer Res.* **71**, 835–835 (2011).
  165. Weber, B., Stresmann, C., Brueckner, B. & Lyko, F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 1001–1005 (2007).
  166. Lujambio, A. *et al.* A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13556–13561 (2008).
  167. Cao, Q. *et al.* Coordinated regulation of polycomb group complexes through microRNAs in cancer. *Cancer Cell* **20**, 187–199 (2011).
  168. Walker, B. E. Tumors of female offspring of mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**, 133–140 (1984).

169. Turusov, V. S., Trukhanova, L. S., Parfenov YuD, null & Tomatis, L. Occurrence of tumours in the descendants of CBA male mice prenatally treated with diethylstilbestrol. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **50**, 131–135 (1992).
170. Newbold, R. R. *et al.* Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* **19**, 1655–1663 (1998).
171. Newbold, R. R. *et al.* Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* **21**, 1355–1363 (2000).
172. Mahawong, P. *et al.* Prenatal diethylstilbestrol induces malformation of the external genitalia of male and female mice and persistent second-generation developmental abnormalities of the external genitalia in two mouse strains. *Differ. Res. Biol. Divers.* **88**, 51–69 (2014).
173. Klip, H. *et al.* Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* **359**, 1102–1107 (2002).
174. Brouwers, M. M. *et al.* Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 666–669 (2006).
175. Titus-Ernstoff, L. *et al.* Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Int. J. Androl.* **33**, 377–384 (2010).
176. Titus-Ernstoff, L. *et al.* Offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES): a preliminary report of benign and malignant pathology in the third generation. *Epidemiol. Camb. Mass* **19**, 251–257 (2008).
177. Skinner, M. K. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2014). doi:10.1016/j.mce.2014.07.019
178. Hackett, J. A. *et al.* Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* **339**, 448–452 (2013).
179. Guerrero-Bosagna, C., Settles, M., Lucker, B. & Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS One* **5**, (2010).
180. Heard, E. & Martienssen, R. A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* **157**, 95–109 (2014).
181. Crews, D. & Gore, A. C. Life imprints: living in a contaminated world. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1208–1210 (2011).
182. Marx-Stoelting, P. *et al.* Assessment of three approaches for regulatory decision making on pesticides with endocrine disrupting properties. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* (2014). doi:10.1016/j.yrtph.2014.09.001

**Résumé:** De nombreux perturbateurs endocriniens sont retrouvés dans notre environnement. Ils interfèrent sur l'action des récepteurs hormonaux. Plusieurs travaux argumentent qu'ils altéreraient la formation des réseaux neuronaux. Un parallèle a été évoqué avec l'augmentation de la prévalence des troubles neurodéveloppementaux. Un mécanisme d'action évoqué est un effet sur la méthylation de l'ADN dans le cerveau en maturation.

**Objectifs:** Étudier les caractéristiques neurodéveloppementales et la signature épigénétique des patients exposés in utero au diethylstilbestrol.

Identifier des régions de méthylation différentielles sur des gènes impliqués dans le neurodéveloppement, pouvant mener à une vulnérabilité psychiatrique.

**Matériels et méthodes:** Nous avons recruté 75 frères et sœurs issus de 31 familles dont au moins un membre fut exposé in utero au diethylstilbestrol. Une évaluation neuropsychiatrique a été réalisée. Nous avons utilisé une puce de méthylation et avons analysé les variations de méthylation de 411 947 CpG.

**Résultats:** Nous avons observé des différences significatives au niveau de symptômes psychiatriques aspécifiques et de signes neurologiques mineurs, tels que la latéralisation, associées à l'exposition. Plusieurs réseaux biologiques présentant des modifications de méthylation sont associés à l'exposition. Ils concernent les fonctions neurodéveloppementales, le métabolisme et l'oncogénèse.

**Conclusion:** L'exposition au diethylstilbestrol paraît associée à des profils cliniques aspécifiques, à des troubles de la latéralisation, et à des altérations de méthylation au sein de réseaux biologiques spécifiques.

#### PRENATAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTORS AND NEURODEVELOPMENTAL RISK: A STUDY OF DIETHYLSTILBESTROL-EXPOSED SIBLINGS.

**Summary:** Many endocrine disruptors are found in our environment. They act on hormonal receptors, on their action and synthesis. They may alter neuronal transmission and neuronal formation. A lot of neurodevelopmental diseases have a growing prevalence, raising many questions about a possible association with endocrine disruptors. One of their action mechanisms may be an effect on DNA methylation of the developing brain.

**Objectives:** To study neurodevelopmental characteristics and the epigenetic signature of patients exposed in utero to diethylstilbestrol. To identify differentially methylated regions in neurodevelopmental related genes, which could lead to a psychiatric vulnerability.

**Materials and Methods:** We recruited 75 siblings from 31 families, in which at least one member was exposed in utero to diethylstilbestrol. A psychiatric evaluation was assessed with standardized questionnaires. We used the Infinium HumanMethylation450 BeadChip and analyzed the methylation variations of 411 947 CpG loci.

**Results:** We found clinical differences in non-specific psychiatric symptoms and in neurological soft signs, such as lateralization, associated with the exposure. We found several biological pathways in which methylation modifications were associated to diethylstilbestrol exposure. These pathways are implicated in neurodevelopmental pathways, general metabolism and oncogenesis mostly.

**Conclusion:** Prenatal diethylstilbestrol exposure seems associated with non-specific psychiatric symptoms, lateralization abnormalities and methylation alterations in genes that participate to pathways known to be involved in psychiatric diseases, notably in neurotransmitters signalization.

Mots-clés: perturbateurs endocriniens, diethylstilbestrol, neurodéveloppement, méthylation de l'ADN.

Key Words: endocrine disruptors, diethylstilbestrol, neurodevelopment, DNA methylation.

Laboratoire de physiopathologie des maladies psychiatriques, équipe 2, MO Krebs – T Jay – U894 – INSERM – Centre de Psychiatrie et de Neurosciences – 2, ter rue d'Alésia – 75014 PARIS.