

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

FACULTE DE MEDECINE

ED 419 BIO-SigNE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 11

Spécialité : Biologie de la reproduction et du développement

Présentée et soutenue publiquement par

Thierry N'TUMBA-BYN

27 Février 2013

MECANISMES D'ACTION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS
BISPHENOL A ET PHTALATES SUR LE DEVELOPPEMENT DU
TESTICULE FŒTAL

Directrice de thèse : Pr. Virginie Rouiller-Fabre

JURY

Pr. Alexandra BENACHI

Présidente

Pr. Xavier COUMOUL

Rapporteur

Pr. Anne-Marie SAILLENFAIT

Rapporteur

Pr. Florence EUSTACHE

Examineur

Pr. Solange MAGRE

Examineur

Pr. Virginie ROUILLER-FABRE

Directeur de thèse

A ceux qui m'ont permis d'écrire ce manuscrit...

... et à ceux qui auront le courage de le lire.

Je tiens à remercier le professeur **Alexandra Benachi** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Un grand merci au docteur **Anne-Marie Saillenfait** et au professeur **Xavier Coumoul** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et d'avoir ainsi permis son amélioration. Merci pour votre enthousiasme et votre méticulosité.

Je remercie également les docteurs **Solange Magre** et **Florence Eustache** pour leur participation en tant qu'examinatrices lors de cette soutenance de thèse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
Abréviations	13
AVANT PROPOS	17
INTRODUCTION	19
I. Développement testiculaire.....	21
I.A. Crêtes génitales et formation de la gonade bipotentielle	21
I.B. Différenciation sexuelle mâle	25
I.B.1. Le gène Sry.....	25
I.B.2. Gènes de la différenciation mâle en aval de l'expression de Sry	27
I.C. Mise en place des différents types cellulaires	29
I.C.1. Cellules de Sertoli	29
I.C.2. Cellules de Leydig	33
I.C.3. Les cellules péritubulaires	38
I.C.4. Les cellules germinales	38
II. Le syndrome de dysgénésie testiculaire	45
II.A. Généralités.....	45
II.B. Les symptômes du TDS et leur origine foetale	46
II.B.1. Hypospadias et Cryptorchidie.....	46
II.B.2. Réduction de la production spermatique.....	47
II.B.3. Cancer testiculaire.....	48
II.C. Les causes du TDS	49
II.C.1. Cause génétique ?	49
II.C.2. Facteurs environnementaux.....	50

III.	Bisphénol A.....	53
III.A.	Généralités.....	53
III.B.	Métabolisme et toxicocinétique.....	56
III.C.	Taux d'exposition de la population.....	57
III.D.	Toxicité du Bisphénol A sur l'organisme.....	59
III.D.1.	Effets du BPA sur la fonction de reproduction mâle.....	60
III.E.	Mécanisme d'action.....	65
III.E.1.	Les récepteurs classiques des oestrogènes.....	65
III.E.2.	Récepteur membranaire GPR30	66
III.E.3.	Estrogen Related Receptor Gamma	66
III.E.4.	Récepteur des androgènes, Aryl hydrocarbon receptor.....	67
IV.	Phtalates.....	69
IV.A.	Généralités.....	69
IV.B.	Métabolisme et toxicocinétique.....	71
IV.C.	Taux d'exposition de la population.....	73
IV.D.	Toxicité du DEHP et du MEHP sur l'organisme.....	75
IV.D.1.	Effets du DEHP et du MEHP sur la fonction de reproduction mâle	76
IV.E.	Mécanisme d'action.....	80
IV.E.1.	Voie des récepteurs PPARs.....	80
IV.E.2.	Autres types de récepteurs	82
V.	Objectifs	84
	MATERIEL ET METHODES	85
I.	Prélèvements.....	86
I.A.	Prélèvement des testicules fœtaux humains.....	86
I.B.	Prélèvement des testicules fœtaux de souris et de rat	87
II.	CULTURE ORGANOTYPIQUE	88

II.A.	Produits et réactifs employés	88
II.B.	Méthode de culture	88
III.	Histologie.....	89
III.A.	Immunohistochimie	90
III.B.	Quantification de l'apoptose et de la prolifération.	91
IV.	Analyse d'expression de gène	91
IV.A.	Extraction d'ARN	91
IV.B.	Real Time quantitative PCR.....	91
IV.C.	Analyse transcriptomique	93
V.	Dosage radioimmunologique de la testostérone.....	93
VI.	Analyses statistiques	94
	RESULTATS.....	95
	Article n°1	96
	Résultats non publiés	99
I.	Effets du BPA sur l'expression de gènes impliqués dans la steroidogenèse.....	101
I.A.	Introduction	101
I.B.	Materiel et Méthodes.....	103
I.C.	Résultats.....	103
I.D.	Discussion.....	103
II.	Etude de l'effet du BPA sur la gamétogenèse.....	105
II.A.	Introduction	105
II.B.	Materiel et Méthodes.....	107
II.C.	Résultats.....	107
II.D.	Discussion.....	108
III.	Analyse transcriptomique	111
III.A.	Introduction	111

III.B. Matériel et Méthodes.....	113
III.C. Résultats.....	113
III.D. Discussion.....	117
Article n°2.....	121
Introduction.....	124
Material and Methods.....	127
Results	128
III.D.1. Effect of MEHP on the apoptosis and the number of germ cells.....	128
III.D.2. Effect of MEHP on Stra8 expression.....	129
III.D.3. Effect of MEHP on germ cells of BAX-/- mice.....	129
III.D.4. Effect of PPAR α and PPAR γ agonists on the apoptosis of germ cells	131
III.D.5. Effect of PPARs agonists on Stra8 expression	132
Discussion.....	133
Références bibliographiques.....	137
DISCUSSION et PERSPECTIVES.....	141
I. Effets du BPA sur le testicule fœtal.....	143
I.A. Culture organotypique et différences inter-espèces.....	143
I.B. Un effet à doses environnementales.....	145
I.C. Mécanismes d'action	146
II. Effets du MEHP sur le testicule fœtal.....	147
II.A. Stra8 et différenciation	147
II.B. Implication de la voie des PPARs	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
ANNEXES.....	181
ARTICLE COMPLEMENTAIRE n°1	183
ARTICLE COMPLEMENTAIRE n°2	185

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Différenciation du tractus uro-génital chez les mammifères.....	20
Figure 2 : Gènes impliqués dans la formation de la gonade bipotentielle.....	22
Figure 3 : Gènes impliqués dans la différenciation sexuelle mâle et leurs interactions.....	24
Figure 4 : Coupes de testicule fœtal chez l’humain, la souris et le rat.....	30
Figure 5 : Diagramme illustrant l’augmentation progressive du nombre de cellules de Sertoli chez l’Homme et chez le rat.	31
Figure 6 : Coupe de testicule fœtal humain de 16 et 12 semaines de gestation.....	34
Figure 7 : Fenêtre de masculinisation	35
Figure 8 : Fonctions endocrines des cellules somatiques.	37
Figure 9 : Parcours migratoire des CGPs lors du développement embryonnaire.....	39
Figure 10 : Protéines du cycle cellulaire impliquées dans l’entrée en quiescence des cellules germinales chez la souris (D’après Western et al., 2008)	41
Figure 11 : Chronologie du développement testiculaire chez l’Homme, le rat et la souris.....	1
Figure 12 : Evolution du nombre et de la qualité des spermatozoïdes entre 1989 et 2004.....	47
Figure 13 : Evolution de l’incidence des cancers testiculaires entre 1975 et 2004 aux Etats-Unis.....	48
Figure 14 : Liens entre facteurs environnementaux et symptômes du TDS (d’après Nordkap et al., 2012).....	52
Figure 15 : Formation du BPA.....	53
Figure 16 : Potentielles sources d’exposition au BPA	54
Figure 17 : Formule semi-développée de la structure générale du bisphénol A, de l’œstradiol et du diéthylstilbestrol.....	55
Figure 18 : Représentation schématique des voies principales de transformation du BPA.	56
Figure 18 : Potentielles sources d’exposition au DEHP	70
Figure 19 : Métabolisation du DEHP et glucuronidation (d’après Testa et al., 2012).....	72
Figure 20 : Effets des phtalates sur le développement du testicule de rat (D’après Corton et al., 2005)	78

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la formation de la gonade bipotentielle.....	23
Tableau 2 : Gènes impliqués dans la formation de la gonade mâle.	26
Tableau 3 : Taux moyens de BPA total retrouvés dans le sang et l'urine d'individus adultes sains	58
Tableau 4 : Taux moyens de BPA libre retrouvés en période de grossesse dans différents fluides biologiques	59
Tableau 5 : Effets du BPA sur le testicule de rongeur après traitement en période fœtale et/ou postnatale.....	62
Tableau 6 : Taux moyens de MEHP mesurés dans les différents fluides biologiques d'adultes sains..	74

Abréviations

0-9

3- β -HSD	: 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase
15d-PGJ2	: 15-desoxy-prostaglandine J2

A

α SMA	: alpha smooth muscle actin
ADN	: acide désoxyribonucléique
AGD	: ano-génital distance
AMH	: anti-Mullerian hormone
ANSES	: agence nationale de sécurité sanitaire
APES	: 3-aminopropyltriéthoxylane
AR	: androgen receptor
ARN	: acide ribonucléique
Atrx	: alpha thalasemia/metal retardation X

B

BBP	: benzylbutyl phtalate
BPA	: bisphénol A
BrDU	: bromo-2-Désoxy-Uridine

C

c-Kit	: <i>récepteur membranaire du SCF</i>
CAR	: constitutive androstane receptor
CBX2	: chromobox homolog 2
CD	: compact disc
Cip	: cdk interacting protein
CIS	: carcinome <i>in situ</i>
CGP	: cellule germinale primordiale
CYP17A1	: cytochrome P450 17A1
CX43	: connexine 43

D

DAZL	: deleted in azoospermia-like
DBP	: di-n-butyl-phtalate
DDT	: dichlorodiphényltrichloroéthane
DDX4	: DEAD box polypeptide 4
DEHP	: di(2-ethylhexyl) phthalate
DES	: diéthylstilbestrol
DHH	: desert hedgehog

DiBP	: diisobutyl phtalate
DJA	: dose journalière admissible
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
DMP	: diméthyl-phtalate
DMRT1	: Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DnBP	: di-n-butyl phtalate
DnHP	: di-n-hexyl-phtalate

E

E2	: œstradiol
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
ER	: estrogen receptor
ERRγ	: estrogen-related receptor gamma

F

FACS	: fluorescence-activated cell sorting
FAI	: free androgen index
FGF9	: fibroblast growth factor 9
FSH	: follicle-stimulating hormone

G

GC/MS	: gas chromatography-mass spectrometry
GCD	: germ cell deficiency
GPR30	: G protein-coupled receptor 30

H

hCG	: human chorionic gonadotropin
HMG	: high mobility group
HPLC	: high-pressure liquid chromatography

I

INK4	: inhibiteur de cdk4
INSERM	: institut national de la santé et de la recherche médicale
INSL-3	: insulin-like 3
ITGCNU	: intra-tubular germ cell neoplasia unclassified

J

jpc	: jour post-coïtum
jpp	: jour post-partum

K

Kip	: kinase inhibitory protein
-----	-----------------------------

L

LH	: luteinizing hormone
LHX9	: LIM homeobox 2

M

MAMLD1	: mastermind-like domain containing protein 1
MBzP	: mono benzyl phthalate
MCF-7	: <i>lignée cellulaire humaine de cancer du sein</i>
MEHP	: mono(2-ethylhexyl) phthalate
MS/MS	: tandem mass spectrometry

N

NANOG	: nanog homeobox
NLS	: nuclear localisation sequence
NOAEL	: no observable adverse effect level

O

OCT3/4	: voir <i>POU5F1</i>
--------	----------------------

P

P450SCC	: cholesterol side-chain cleavage enzyme
PBS	: phosphate buffer saline
PCNA	: proliferating cell nuclear antigen
PCR	: polymerase chain reaction
PDGF	: platelet-derived growth factor
PE	: perturbateur endocrinien
PGD ₂	: prostaglandine D ₂
PI3K	: phosphoinositide 3 kinase
POU5F1	: POU class 5 homeobox 1
PPAR	: peroxisome proliferator activated receptor
PVC	: polyvinyl chloride
PXR	: pregnan X receptor

R

RA	: retinoic acid
RAR	: retinoic acid receptor
RSPO1	: r-spondin 1
RXR	: retinoid x receptor

S

SA	: semaine d'aménorrhée
SCF	: stem cell factor
SF-1	: steroidogenic factor 1
SG	: semaine de gestation
SHBG	: sex hormone-binding globulin
SIDDT	: sudden infant death with dysgenesis of the testes
SOX9	: sry-like HMG-box protein 9
SRY	: sex determining region on Y chromosome
SSC	: side scatter
SSEA-1	: stage-specific embryonic antigen 1
STAR	: steroid acute regulatory protein
STRA8	: stimulated by retinoic acid 8

T

TDF	: testis determining factor
TDS	: testicular dysgenesis syndrome
TGCT	: testicular germ cell tumor
TGFβ	: transforming growth factor β
TSPYL1	: testis specific Y-like 1
TZD	: thiazolidinedione

V

VASA	: voir <i>DDX4</i>
------	--------------------

W

WT1	: Wilm's tumor 1
WNT4	: wingless-type MMTV integration site family, member 4

Z

ZO-1	: zona occludin-1
------	-------------------

AVANT PROPOS

On observe depuis plusieurs années, dans les populations occidentales, une augmentation de l'apparition de pathologies liées au système de reproduction chez l'Homme. Les pathologies liées au système de reproduction mâle ont d'ailleurs été regroupées sous le terme de « syndrome de dysgénésie testiculaire ». Plusieurs études suggèrent que l'apparition de ce syndrome pourrait être due à la présence de plus en plus importante des polluants environnementaux dans notre vie quotidienne.

En effet, plusieurs produits utilisés en tant que plastifiants dans des objets de consommation courante sont incriminés en tant que perturbateurs endocriniens. Les perturbateurs endocriniens sont des composés chimiques capables d'interférer avec les hormones naturelles et d'en altérer la fonction. Parmi les plastifiants les plus produits dans le monde, le bisphénol A et les phtalates font l'objet de nombreuses études concernant leurs caractères toxiques dans différents organes, et notamment dans les organes de la fonction de reproduction.

Les polluants environnementaux et particulièrement les bisphénol A et les phtalates, font l'objet de multiples débats, dans les milieux scientifiques, politiques et également dans l'opinion publique. Des questions d'un intérêt public majeur sont posées : A quelles concentrations sommes nous exposés ? Quelles sont les doses nocives ? Quels sont les effets des perturbateurs endocriniens sur notre santé ? Comment agissent ces perturbateurs endocriniens dans l'organisme ?

Le but de ce travail de thèse est d'apporter quelques éléments de réponse à ces questions importantes que toute personne, scientifique ou non, peut se poser à l'évocation de potentiels effets néfastes de ces plastifiants. Afin de répondre au mieux à ces questions, notre étude s'est focalisée sur un organe, le testicule, à une période de développement particulièrement sensible aux dérèglements hormonaux, la période fœtale.

Mon étude s'est développée autour de trois espèces de mammifères. D'une part le rat et la souris, qui sont les modèles classiques d'études expérimentales dans le domaine de la toxicologie, et d'autre part le modèle humain. Grâce à une collaboration établie depuis plusieurs années entre notre laboratoire et le service de gynécologie-obstétrique de l'Hôpital Antoine Béchère, nous avons la possibilité d'effectuer nos études sur les gonades de fœtus issus d'interruptions volontaires de grossesse réalisées au premier trimestre de gestation. Pendant cette période du développement de l'individu, se mettent en place les premières

structures du système de reproduction. C'est en période fœtale qu'apparaissent les cellules germinales qui, à l'âge adulte, se différencieront en gamètes fonctionnels, capables d'assurer la reproduction de l'espèce. Ces cellules subissent plusieurs étapes de différenciation, grâce au soutien des cellules somatiques, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. Les cellules somatiques possèdent plusieurs fonctions, principalement endocrines, qui permettent le développement des cellules germinales et des caractères sexuels primaires et secondaires. La perturbation par un élément exogène des interactions établies en période fœtale entre ces trois types cellulaires peut avoir des répercussions importantes sur la fonction de reproduction à l'âge adulte.

Le développement des gonades chez l'Homme possède de nombreuses similitudes avec celui de la souris et du rat. Ainsi, grâce au modèle de culture organotypique de testicule fœtal développé dans notre laboratoire, nous avons réalisé nos expérimentations dans les mêmes conditions et à la même période de développement à la fois chez l'Homme et chez les rongeurs.

Les résultats de cette thèse seront présentés en trois parties :

Dans un premier article publié dans la revue « PLoS One », nous avons démontré les effets différentiels du bisphénol A et du diéthylstilbestrol dans le testicule fœtal chez l'Homme, le rat et la souris.

Une deuxième partie des résultats est consacrée aux données non publiées concernant les effets du bisphénol A sur la stéroïdogénèse, la gamétogénèse et les modifications transcriptionnelles induites dans le testicule fœtal.

Enfin, la troisième partie concerne un article en cours d'écriture à propos des mécanismes impliqués dans l'effet pro-apoptotique des phtalates dans les cellules germinales mâles chez la souris. En effet, des études effectuées antérieurement au laboratoire ont clairement mis en évidence l'effet délétère d'un phtalate, le MEHP (mono-2-éthyl-hexyl phtalate) sur les cellules germinales fœtales mâles à la fois chez la souris et chez l'Homme. Désormais, notre but est de comprendre les mécanismes d'action impliqués.

A la fin de mon manuscrit, dans la partie « Annexes », j'ai inclus deux articles dont je suis co-auteur, mais par souci de clarté, j'ai décidé de ne pas les inclure dans mes résultats.

INTRODUCTION

Principe de la différenciation sexuelle

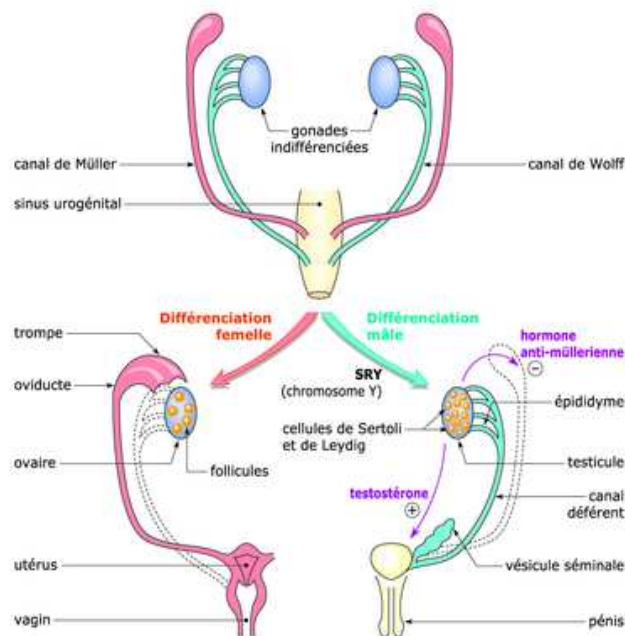


Figure 1: Différenciation du tractus uro-génital chez les mammifères.

Avant la détermination sexuelle de la gonade, le mésonephros contient le canal de Wolff et le canal de Müller. Après la différenciation gonadique, les cellules somatiques testiculaires (cellules de Sertoli et cellules de Leydig), vont sécréter de l'AMH et de la testostérone qui va entraîner respectivement la dégradation du canal de Müller et le maintien du canal de Wolff. Chez la femelle, en absence d'AMH et de testostérone, le canal de Wolff va régresser et le canal de Müller va se développer et se différencier.

I. Développement testiculaire

Au cours du développement embryonnaire, une cascade d'évènements se produisant dans les tissus primordiaux permet d'aboutir à la formation d'une gonade fonctionnelle, qui à l'âge adulte sera capable de produire les gamètes permettant d'assurer la pérennité de l'espèce. L'étape primordiale, qui déterminera le sexe de l'individu est la fécondation en elle-même, où sera apporté le chromosome X ou Y paternel, qui induira le développement d'un individu phénotypiquement mâle ou femelle. Chez le mâle, les étapes se succèdent, de la formation d'une gonade bipotentielle à sa différenciation en testicule sous l'influence de différents gènes et notamment le gène Sry, porté par le chromosome Y. Ces gènes permettront la différenciation des différents types cellulaires composant le testicule. Ces cellules, par leurs rôles dans la structure et par leurs fonctions endocrines, vont permettre un développement testiculaire complet, aboutissant à la production de gamètes fonctionnels. Ce chapitre est consacré aux données concernant le développement foetal du testicule.

I.A. Crêtes génitales et formation de la gonade bipotentielle

Au cours du développement embryonnaire, la première étape dans la formation du système de reproduction est le développement des crêtes génitales. Le mésoderme intermédiaire, qui compose une grande partie de la cavité coelomique est divisé en 3 parties : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Le pronéphros formera les glandes surrénales primaires et le métanéphros sera le support du développement des reins. C'est à partir du mésonéphros que se différencieront les voies génitales mâles (canaux de Wolff) ou femelles (canaux de Müller). Au moment de sa formation, autour de la 4^{ème} semaine de gestation (SG) chez l'Homme et dès 10 jours post-coitum (jpc) chez la souris (George et Wilson 1994, Olaso and Habert, 2000), la crête génitale constitue une gonade bipotentielle, composée de cellules précurseurs ayant la capacité de se diriger vers la voie mâle ou vers la voie femelle. Chez l'Homme, ce stade indifférencié dure environ 7 à 10 jours (Jirasek, 1971a, Rabinovici and Jaffe, 1990).

Selon le sexe génétique de l'individu, seule une des deux structures prendra forme (Josso, 1970, Jost et Magre 1993). Chez le mâle, les canaux de Müller régressent, sous l'influence de l'AMH (anti-Müllerian hormone) sécrétée par les cellules de Sertoli et les canaux de Wolff se développent, grâce à la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig, et vont former le

canal déférent, les vésicules séminales et l'épididyme (Jost and Magre, 1993, George and Wilson, 1994) (Fig. 1).

Les signaux cellulaires responsables de la différenciation vers la voie mâle ou femelle ne sont pas encore totalement décrits, cependant, certains gènes sont connus pour avoir des rôles majeurs dans cette différenciation. Certains gènes tels que *Emx2* (empty spiracle homeobox 2), *Sf-1* (steroidogenic factor-1), *Wt-1* (Wilm's tumor 1), *Lhx9* (LIM homeobox 9) ou *Gata4* jouent d'abord un rôle dans la formation de la gonade bipotentielle, et sont également important par la suite pour la différenciation mâle (Barrionuevo et al., 2012) (Fig. 2) (Tableau 1).

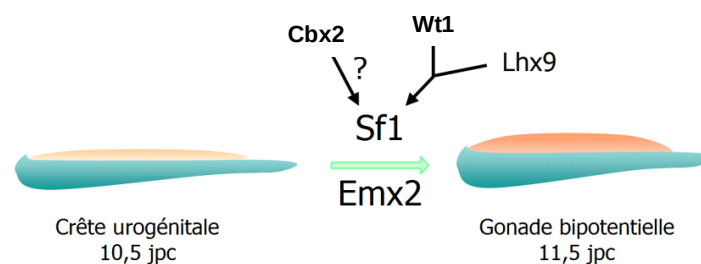


Figure 2 : Gènes impliqués dans la formation de la gonade bipotentielle.

SF-1 joue un rôle fondamental dans la formation de la gonade bipotentielle, sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription et autres protéines de régulation.

Le gène *Sf-1* (ou NR5A1) code pour un récepteur orphelin de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il possède un rôle fondamental dans la formation de la gonade bipotentielle dès la 7^{ème} semaine de gestation chez l'Homme (Biason-Lauber, 2010). Chez la souris, une invalidation du gène entraîne un défaut de développement des gonades ainsi que des glandes surrénales. Les gonades se développent jusqu'à 11,5 jpc, puis dégénèrent (Luo et al., 1994). *Sf-1* joue aussi un rôle particulier dans la différenciation du testicule, ce rôle sera décrit plus loin.

Wt-1 code pour un facteur de transcription dont l'invalidation est associée aux tumeurs de Wilms du rein embryonnaire (Haber et al., 1990). Ce gène est exprimé dès les premières étapes de la formation de la gonade bipotentielle, dans les tissus mésodermiques embryonnaires. Sa mutation chez l'Homme se caractérise par une dysgénésie gonadique (maintien des canaux de Müller et féminisation des caractères sexuels primaires et secondaires) (Meacham et al., 1991, Veitia et al., 2001). Chez la souris, comme en absence

de *Sf-1*, l'invalidation de *Wt-1* entraîne une dégénérescence des gonades à 11,5 jpc (Kreidberg et al., 1993).

Lhx9 code également pour un facteur de transcription. Il présente chez la souris un profil d'expression similaire à celui de *Sf-1* et serait capable de lier le promoteur de *Sf-1*. Son invalidation chez la souris induit une absence de prolifération des cellules somatiques (Birk et al., 2009).

Cbx2 (chromobox homolog 2) appartient à la famille des protéines « Polycomb », capables de former des complexes liant la chromatine et permettant ainsi de réguler le niveau de transcription de certains gènes. Si *Cbx2* semble jouer un rôle dans le niveau d'expression de *Sf-1* (Kato-Fukui et al., 2005), son implication directe n'est pas établie. Sa mutation chez l'Homme induit une réversion sexuelle complète des individus XY (Biason-Lauber et al., 2009).

Emx2 est un gène à homeobox, dont l'invalidation entraîne un défaut de développement de l'épithélium coelomique et du mésonéphros (Miyamoto et al., 1997).

	Chromosome (Human)	Molecular defect	Human Male phenotype	Mouse Male phenotype
Emx2	10q26.1	LOF	Normal (?)	No urogenital tract No gonads
Lhx9	1q31.q32	LOF	NR	No gonads Müllerian ducts
Wt1	11p3	LOF	- Ambiguous or female external genitalia - Dysgenetic gonads	No urogenital tract No gonads
Cbx2	17q25	LOF	- Ovaries with oocytes - Female external genitalia Müllerian +	- Gonads : Ovaries 50%, Testis+Ovary 25%, Undefined 25% - Internal genitalia: Female (Bipartite uterus) 75%, Male (Monopartite Uterus + Deferens) 25% - External genitalia: Male 16%, Female 33%, Intersex 50%

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la formation de la gonade bipotentielle

Leur localisation chromosomique chez l'Homme est spécifiée. Les phénotypes observés après mutation chez l'Homme ou invalidation chez la souris sont indiqués. (LOF, loss of function ; NR, not reported) (D'après Biason-Lauber et al., 2010)

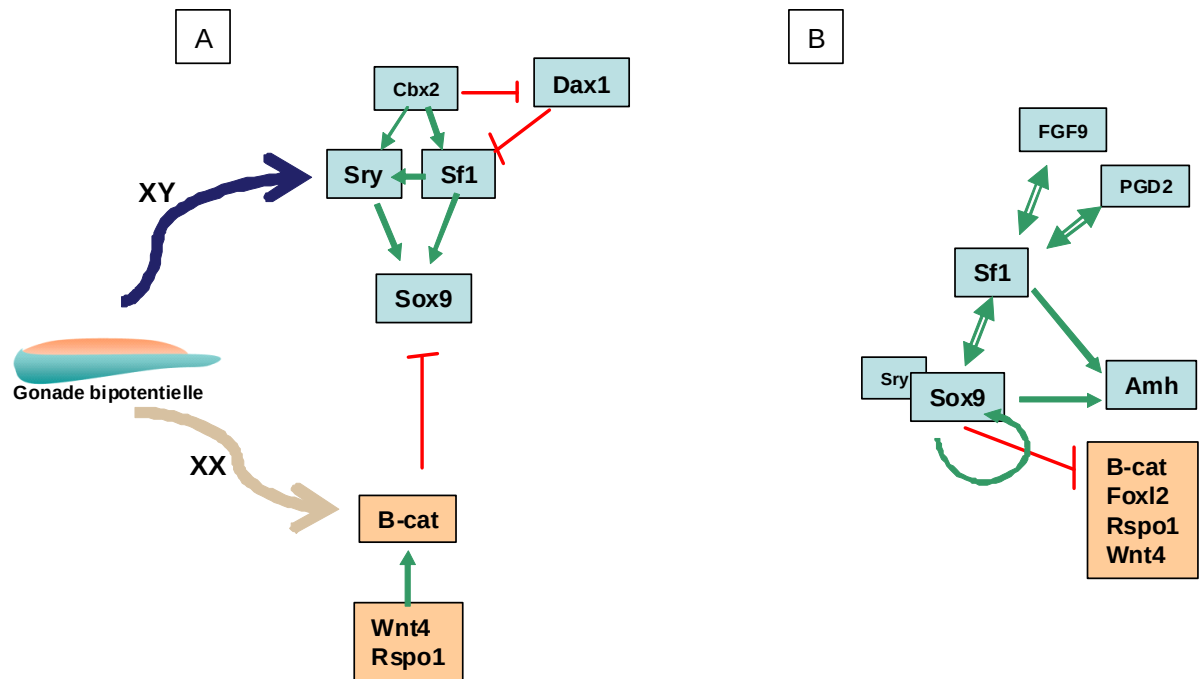


Figure 3 : Gènes impliqués dans la différenciation sexuelle mâle et leurs interactions

A : La différenciation de la gonade bipotentielle en testicule s'effectue sous l'influence de *Sry*, régulé par *Sf-1* et *Cbx2*. *Sry* et *Sf-1* vont induire l'expression de *Sox9* qui permettra le maintien des caractères mâles. La différenciation femelle se fait par la voie *Wnt4*/β-caténine. B : Le maintien des caractères de différenciation mâle se déroule grâce à *Sox9* qui maintien son expression par auto-régulation et sous l'influence de *Fgf9*, *Pgd2* (prostaglandine D2), et *Sf-1*. Cette cascade permet l'expression de l'AMH dans les cellules de Sertoli (D'après Biason-Lauber et al., 2010).

I.B. Différenciation sexuelle mâle

I.B.1. Le gène Sry

La notion de détermination sexuelle liée au chromosome Y émerge dans les années 50, avec les premières études caryotypiques réalisées sur des individus XXY ou XO (Ford et al., 1959, Jacobs and Strong, 1959). C'est à cette période qu'apparaît la notion de Testis Determining Factor (TDF), qui serait présent sur ce chromosome. Des années plus tard, par des études de translocations chromosomiques chez des individus femmes XY et hommes XX, le « TDF » est localisé près de la région post-autosomale du bras court du chromosome Y, et le gène Sry (sex-determining region of Y chromosome) est isolé (Palmer et al., 1989, Gubbay et al., 1990). Chez la souris, plusieurs études ont permis de démontrer que le gène Sry est nécessaire et suffisant à l'induction du développement d'un individu phénotypiquement mâle (Koopman et al., 1991, Gubbay et al., 1990). Sry est exprimé dans la crête génitale juste avant la formation des cordons séminifères, dès le début de la 6^{ème} semaine de gestation chez l'Homme et dès 10,5 jpc chez la souris. Il connaît ensuite un pic d'expression aux alentours du 44^{ème} jpc chez l'Homme et à 11,5 jpc chez la souris. Son expression est maintenue chez l'Homme après la différenciation testiculaire jusqu'à l'âge adulte (Hanley et al., 2000, Salas-Cortes et al., 1999), alors que chez la souris, son expression n'est que transitoire au cours du développement, son expression diminue autour de 12 jpc jusqu'à devenir indétectable (Taketo et al., 2005, Sekido and Lovell-Badge, 2009, Lovell-Badge, 1993). Sry est un gène constitué d'un seul exon et codant pour une protéine contenant un domaine conservé, appelé boîte HMG (high mobility group). Ce domaine permet la liaison à l'ADN ce qui suggère une fonction de facteur de transcription pour cette protéine (Lovell-Badge, 1992). Ainsi, son expression transitoire dans la gonade fœtale murine serait suffisante à l'induction d'une cascade de gènes responsables de la masculinisation de la gonade. Quelque soit sa composition chromosomique, la présence du gène Sry permet le développement d'un phénotypqe mâle, comme le démontrent les expériences de Koopman et al. réalisées sur des embryons XX, devenus phénotypiquement mâles après micro-injection de la séquence promotrice et du gène Sry (Koopman et al., 1991).

	Chromosome (Human)	Molecular defect	Human male phenotype	Mouse male phenotype
Sry	Yp11.3	LOF	- Dysgenetic testes - Müllerian + - Female or ambiguous external genitalia	Dysgenetic testes Müllerian +
Sox9	17q24.3-q25.1	LOF	- Dysgenetic testes - Müllerian +/-	No urogenital tract No gonads
Sf1/NR5A1	9q33	LOF	- Dysgenetic or absent testes - Female or ambiguous external genitalia - Müllerian +	Absent gonads
Dmrt1	9q24.3	LOF	- Dysgenetic testes - Female or ambiguous external genitalia - Müllerian +/-	NR
Dax	Xp21.3-p21.2	LOF	Normal	Impaired spermatogenesis
		Duplication	- Dysgenetic testes - Female or ambiguous external genitalia - Müllerian +/-	NR
Dhh	12q13.1	LOF	- Dysgenetic testes - Ambiguous genitalia	Impaired spermatogenesis
Atrx	Xq13	LOF	- Dysgenetic testes - Ambiguous or male external genitalia - Müllerian NR	NR
Wnt4	1p35	Duplication	- Dysgenetic testes - Ambiguous external genitalia - Müllerian +	Disruption normal testicular vasculature and function, but does not lead to an XY sex-reversed
TSPYL1	6q22-q23	LOF	- Dysgenetic testes - Ambiguous genitalia	NR
Mamld1	Xq28	LOF	- Hypospadia	NR

Tableau 2 : Gènes impliqués dans la formation de la gonade mâle.

Leur localisation chromosomique chez l'Homme est spécifiée. Les phénotypes observés après mutation chez l'Homme ou invalidation chez la souris sont indiqués. (LOF, loss of function ; NR, not reported) (D'après Biason-Lauber et al., 2010)

I.B.2. Gènes de la différenciation mâle en aval de l'expression de Sry

La cascade d'expression de gènes induite par *Sry* n'est pas connue de façon précise. Plusieurs gènes sont effectivement induits par *Sry*, cependant de multiples régulations indirectes peuvent avoir lieu (Wilhelm et al., 2007).

Sox9 (Sry-like HMG-box protein 9) est le premier gène dont l'expression augmente fortement suite à l'expression de *Sry* (Sekido et al., 2004). Les deux gènes possèdent un profil d'expression très similaire dans le testicule, alors que dans l'ovaire, l'expression de *Sox9* est très faible. Chez la souris, il a été décrit que *Sry* et *Sf-1* seraient capables de former un complexe se liant à la séquence promotrice de *Sox9* afin d'induire son expression. Par la suite, *Sox9* et *Sf-1* se lieraient également à cette même séquence promotrice afin de s'auto-réguler (Sekido and Lovell-Badge, 2008). La mutation du gène chez l'Homme entraîne une réversion sexuelle des individus XY ainsi qu'une dysplasie campomélique, pathologie de la formation osseuse (Wagner et al., 1994), alors que sa duplication chez les individus XX entraîne l'apparition d'un phénotype mâle (Huang et al., 1999).

Pendant plusieurs années, la voie femelle était supposée être la voie par défaut, se développant de façon passive en l'absence d'expression des gènes de différenciation mâle. Aujourd'hui, des gènes de différenciation femelle ont été mis en évidence. *Wnt4*, β -caténine et *Rspo-1* (R-spondin-1) sont les principaux gènes de cette différenciation et leur influence inhibe l'expression de *Sox9* dans l'ovaire (Baillet et al., 2011, Biason-Lauber, 2010) (Fig. 3).

Le gène *Sf-1*, en plus de son implication dans le développement de la gonade bipotentielle joue un rôle important dans la différenciation mâle. En effet, *Sf-1* induit la sécrétion d'AMH par les cellules de Sertoli, permettant ainsi la régression des canaux de Müller. Il induit aussi la synthèse de testostérone en activant les enzymes de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig. L'invalidation de *SF-1* chez l'Homme entraîne une agénésie gonadique, ce qui démontre son implication dans la mise en place de la gonade bipotentielle (Biason-Lauber, 2010). Les mutations de *SF-1* chez l'Homme peuvent induire différents phénotypes allant de l'ambiguïté génitale à des cas de réversion sexuelle complète avec présence de structures Müllériennes chez des individus XY (Lin et al., 2007, Veitia et al., 2001). De plus, comme décrit précédemment, *Sf-1* est capable de former des complexes protéiques se fixant au niveau des promoteurs, permettant ainsi de réguler l'expression de différents gènes de cette voie de différenciation.

Fgf9 (fibroblast growth factor 9), est un membre de la famille des fibroblast growth factor. Il s'exprime spécifiquement au niveau des cordons séminifères en période fœtale et il fait

partie des gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription Sox9. L'expression de *Fgf9* serait corrélée à la synthèse de testostérone (Chen et al., 2007). Chez la souris, l'inactivation de *Fgf9* est létale à la naissance et une réversion sexuelle est observable en période fœtale (Bagheri-Fam et al., 2008, Colvin et al., 2001).

L'expression du gène *DMRT1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) est restreinte au testicule chez l'Homme (Moniot et al., 2000, Raymond et al., 2000). Sa mutation chez l'Homme entraîne une féminisation des organes sexuels externes ainsi que des cas de cryptorchidie (Muroya et al., 2000). Connue pour être impliquée dans le déterminisme sexuel chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, *DMRT1* serait également chez l'Homme un facteur déterminant de la différenciation sexuelle mâle (Kopp, 2012). Chez la souris, il est également exprimé dans le testicule fœtal. Il jouerait un rôle dans la différenciation des cellules germinales (Krentz et al., 2009).

Le gène *TSPYL1* (testis Specific Y-like 1) code pour une protéine impliquée dans l'assemblage du nucléosome responsable de la compaction de la chromatine (Scherl et al., 2002, Vogel and Schmidtke, 1998). Ce gène est muté dans le syndrome de la mort subite du nourrisson avec dysgénésie testiculaire (SIDDT). Les enfants XY atteints par cette mutation présentent des organes génitaux externes ambigus et une déficience en testostérone. Cette pathologie est souvent létale dans la première année de vie (Hering et al., 2006, Puffenberger et al., 2004). Il est important de noter que les patients atteints du syndrome de mort subite du nourrisson sans dysgénésie testiculaire ne portent pas la mutation du gène *TSPYL1* (Hering et al., 2006). Des dérèglements de la fonction testiculaire ont également été décrits chez des souris mutantes pour *Tspy* (Schubert et al., 2008).

Les mutations de plusieurs autres gènes entraînent des dysgénésies gonadiques et réversions sexuelles chez les individus XY, notamment *Dhh* (desert hedgehog), nécessaire à la formation des cordons séminifères (Clark et al., 2000, Yao et al., 2002), *Atrx* (alpha thalasemia/metal retardation syndrome X-linked) ou *Mamld1* (mastermind-like domain containing protein 1) (Fukami et al., 2006, Reardon et al., 1995, Umehara et al., 2000).

Le développement testiculaire est donc induit par l'expression d'une série de gènes dont les interactions ne sont pas toutes connues, néanmoins, l'inactivation de nombreux gènes induit une réversion sexuelle des individus XY, permettant ainsi d'établir un lien entre l'expression de ces gènes et la différenciation vers la voie mâle (Fig. 3). Il est clair que la liste des gènes présentée ci-dessus n'est pas exhaustive, d'autres gènes peuvent intervenir dans la différenciation sexuelle mâle, cependant les principaux gènes dont les rôles sont connus ont été décrits.

I.C. Mise en place des différents types cellulaires

Trois types cellulaires majeurs occupent le testicule fœtal. Les cellules germinales fœtales, futurs gamètes, responsables de la transmission du patrimoine génétique de l'individu. Les cellules de Sertoli, cellules de support, sécrétrices d'AMH et formant les cordons séminifères avec les cellules germinales. Enfin, les cellules de Leydig fœtales, dont les principales fonctions sont la sécrétion de testostérone et d'Insl-3 (insulin-like factor 3), facteurs responsables de la masculinisation du fœtus. Le testicule fœtal comporte également des cellules péritubulaires retrouvées au périmètre des cordons séminifères.

I.C.1. Cellules de Sertoli

Découverte par le médecin Enrico Sertoli en 1865, elles constituent, dans la gonade bipotentielle, les premières cellules à se mettre en place. Leur différenciation débute avec l'expression de *SRY* dans les cellules dérivées de l'épithélium coelomique des gonades XY (Schmahl et al., 2000, Pereda et al., 2006), et se poursuit avec une augmentation de leur taux de prolifération (Palmer and Burgoyne, 1991). Chez l'Homme, les cellules de Sertoli commencent à exprimer *SRY* entre 41 et 44 jpc. *SRY* va alors stimuler l'expression de *SOX9* va à son tour activer *FGF9* et la prostaglandine D2 (*PGD2*), contribuant ainsi à la différenciation des cellules de Sertoli (Piprek, 2010).

Entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine de gestation chez l'Homme, vers 12 jpc chez la souris, et à 13 jpc + 9 heures chez le rat (Magre et al., 1980, Magre and Jost, 1991), les cellules de Sertoli s'agrègent autour des cellules germinales et s'associent aux cellules myoïdes péritubulaires afin de former des structures particulières appelées cordons séminifères (Fig. 4). Les cellules péritubulaires se différencient sous le contrôle du facteur Dhh sécrété par les cellules de Sertoli (Clark et al., 2000, Yao et al., 2002). Ces cellules fusiformes vont participer à la production de la lame basale délimitant les cordons séminifères, formant ainsi un environnement clos nécessaire au bon développement des cellules germinales mâles (Hadley et al., 1985, Skinner et al., 1985). Après la naissance, ces cordons formeront les tubes séminifères, structures épithéliales (possédant une lumière) dans lesquelles se différencieront les cellules germinales.



Figure 4 : Coupes de testicule fœtal chez l'humain, la souris et le rat.

Après 7 semaines de gestation chez l'Homme, 12 jpc chez la souris et 13 jpc + 9 heures chez le rat, les cordons séminifères sont formés. Les cellules de Sertoli (pointes de flèche blanches) sécrètent l'AMH (en violet) et encerclent les cellules germinales (pointes de flèche noires). Autour, l'espace interstitiel est composé principalement des cellules de Leydig, fibroblastes et macrophages.

Chez l'Homme, le développement des cellules de Sertoli est caractérisé par une phase de prolifération active pendant la vie fœtale (Sharpe et al., 2003). Des augmentations conséquentes du nombre de cellules de Sertoli ont été observées à la fois au premier trimestre de grossesse (Bendsen et al., 2003), au début du deuxième trimestre (O'Shaughnessy et al., 2007), ainsi qu'au troisième trimestre (Cortes et al., 1987) (Fig. 5). En plus d'une forte prolifération, plusieurs études démontrent un faible taux d'apoptose, inférieur à 2% dans ces cellules au cours de la vie fœtale (Berensztein et al., 2002, Helal et al., 2002). Chez la souris, la prolifération des cellules de Sertoli est également importante, et atteint un pic à 17,5 jpc. Le taux de multiplication diminue alors progressivement avant de s'arrêter complètement à 17 jours post-partum (jpp) (Vergouwen et al., 1991) (Fig. 5).

Le nombre de cellules de Sertoli mises en place pendant la vie fœtale fait partie des facteurs déterminants pour le bon déroulement de la gamétogenèse et peut avoir une influence directe sur les concentrations spermatiques retrouvées à l'âge adulte (Orth et al., 1988).

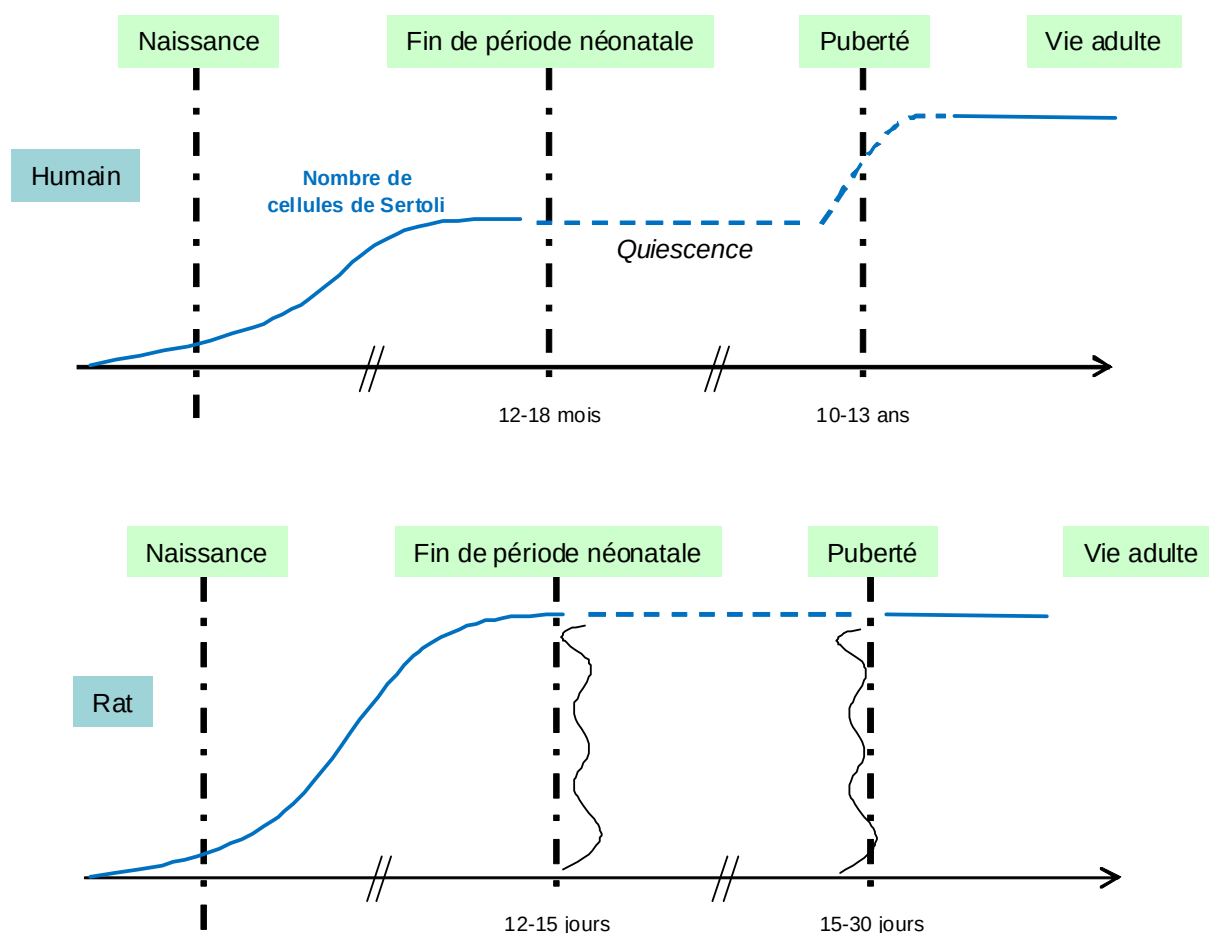


Figure 5 : Diagramme illustrant l'augmentation progressive du nombre de cellules de Sertoli chez l'Homme et chez le rat.

Les lignes pointillées représentent une absence de données précises. Chez le rat, le nombre de cellules de Sertoli maximal est atteint dès la fin de la période néonatale. (D'après Sharpe et al., 2003)

Le maintien du développement correct du testicule dépend de l'expression de plusieurs facteurs spécifiques des cellules de Sertoli.

Sous l'influence de *SOX9* et de *SF-1*, les cellules de Sertoli sécrètent l'AMH très précocement au cours du développement (Arango et al., 1999, Josso et al., 2006). Son expression est détectable chez la souris dès 12 jpc et chez l'Homme dès la 6^{ème} semaine de gestation, à la formation des cordons séminifères (Rajpert-De Meyts et al., 1999, Lambrot et al., 2006b). L'AMH est une glycoprotéine de la famille du TGF β (transforming growth factor β) dont l'action permet la régression des canaux de Müller à partir de la 8^{ème} semaine de gestation (Franke et al., 2004, Josso et al., 1993). Son expression est élevée en vie fœtale et néonatale, puis diminue à la puberté, quand les cellules de Sertoli sont définitivement

différenciées (Baker and Hutson, 1993, Grinspon and Rey, 2010, Lee et al., 1996, Rey et al., 1993, Tran et al., 1987).

Deux autres types de protéines appartenant à la famille du TGF β sont sécrétées par les cellules de Sertoli ; les inhibines et les activines. Ces protéines ont été découvertes grâce à leur rôle dans la régulation de la sécrétion de la FSH (follicle stimulating hormone) par la glande hypophysaire (Vale et al., 1988). Les activines sont des dimères formés par la sous-unité activine associée à une sous-unité inhibine beta, dont il existe 4 formes : β A, β B, β C, β E. Les inhibines sont des hétéro-dimères formés par la sous-unité alpha de l'inhibine et l'une des sous-unités β . Ces protéines ne sont pas spécifiques des cellules de Sertoli, puisque les cellules de Leydig sont également capables de les exprimer (Anderson et al., 2002, Mendis et al., 2011). Les récepteurs de l'activine ActRIIA et ActRIIB sont exprimés dans tout le testicule avec une expression plus spécifique de ActRIIA dans les cellules germinales et dans les cellules interstitielles. Le récepteur de l'inhibine, le beta-glycane s'exprime spécifiquement des les cellules péritubulaires. Les protéines de la famille du TGF β interviennent dans des voies de signalisation de différenciation des cellules germinales (Barakat et al., 2012) mais le rôle exact des activines/inhibines humaines n'est pas entièrement décrit dans le testicule fœtal.

Les cellules de Sertoli sécrètent également d'autres facteurs comme Dhh, qui permet le développement des cellules péritubulaires (Clark et al., 2000, Yao et al., 2002). Elles sécrètent également la transferrine dès la 8^{ème} semaine de gestation chez l'Homme (Balboni et al., 1995). Chez l'adulte, cette protéine permet le transport du fer vers les cellules germinales à travers les jonctions serrées (Sylvester and Griswold, 1994).

Par ailleurs, les cellules de Sertoli sont aussi caractérisées par différents marqueurs non sécrétés. La cytokératine 18, spécifique des filaments intermédiaires des cellules épithéliales, dont les cellules de Sertoli, est fortement exprimée dans le testicule fœtal humain (Franke et al., 2004). Il constitue d'ailleurs à l'âge adulte un marqueur de tubes séminifères immatures ou dédifférenciés (Steger et al., 1996, Maymon et al., 2000).

Les cellules de Sertoli, par la formation des cordons séminifères, et par les différentes interactions cellulaires qu'elles établissent sont indispensables au déroulement du développement testiculaire. Le développement normal des cellules de Sertoli est une étape essentielle à la formation et à la différenciation des cellules germinales (Sharpe et al., 1999) et également des cellules interstitielles. Ainsi, une relation directe entre la production spermatique et le nombre de cellules de Sertoli a été décrite (Johnson et al., 1984, Orth et al., 1988, Petersen and Soder, 2006).

I.C.2. Cellules de Leydig

Ces cellules doivent leur nom à Franz von Leydig qui les a identifiées en 1850. Elles se différencient à partir de progéniteurs mésenchymateux (Niemi et al., 1967), et sont identifiables autour de la 8^{ème} semaine de gestation chez l'Homme, dans le tissu interstitiel du testicule (O'Shaughnessy et al., 2006, Ostrer et al., 2007, Rabinovici and Jaffe, 1990) (Fig. 6). Leur maturation est certainement encore plus précoce étant donné que la sécrétion de testostérone est détectable dès 6-7 semaines de gestation (Lambrot et al., 2006b, Reyes et al., 1973, Tapanainen et al., 1981). Les cellules de Leydig sont visibles dès 12,5 jpc chez la souris, et dès 13,5 jpc chez le rat.

Les progéniteurs se différenciant en cellules de Leydig sont caractérisés par un développement marqué du réticulum endoplasmique lisse, et une augmentation du nombre et de la taille des mitochondries, ainsi qu'une augmentation de la quantité de gouttelettes lipidiques, nécessaires, à la synthèse des stéroïdes, la principale fonction des cellules de Leydig (Pelliniemi and Niemi, 1969). Cette différenciation pourrait être due à la sécrétion de facteurs tels que Sf-1 et Dhh, sécrétés par les cellules de Sertoli (Barsoum and Yao, 2010, Bitgood et al., 1996). Les souris *Ptched-1*, invalidées pour le *Dhh* présentent un faible nombre de cellules de Leydig (Yao et al., 2002). De même, une étude de la protéine Pdgf (platelet-derived growth factor), sécrétée par les cellules de Sertoli démontre que l'absence du récepteur *Pdgfra* inhibe la différenciation des cellules de Leydig fœtales (Brennan et al., 2003). Chez l'Homme, une mutation de *DHH* ou de *PDGFRα* induit une dysgénésie gonadique (Brennan and Capel, 2004, Ross and Capel, 2005).

En opposition, la voie *NOTCH* inhibe la différenciation des cellules de Leydig. Son inactivation augmente de façon considérable le nombre de cellules de Leydig, et son activation constitutive le diminue (Tang et al., 2008).

Chez les mammifères, on distingue de façon stricte les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Leydig adultes. Bien que les deux types cellulaires soient responsables de la synthèse de testostérone, ils possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles propres (Habert et al., 2001, Merchant-Larios et al., 1993, Habert and Picon, 1984). La possibilité d'une origine commune aux deux types cellulaires est encore discutée (Griswold and Behringer, 2009).

Les cellules de Leydig fœtales produisent les androgènes nécessaires à la masculinisation du fœtus et participent avec l'Insl-3, facteur également sécrété par les cellules de Leydig fœtales, à la descente testiculaire. Après la naissance, une deuxième population de cellules de Leydig entre en jeu et commence à synthétiser la testostérone qui sera nécessaire à la

puberté et qui permettra le maintien de la spermatogenèse tout au long de la vie de l'individu (O'Shaughnessy et al., 2006).

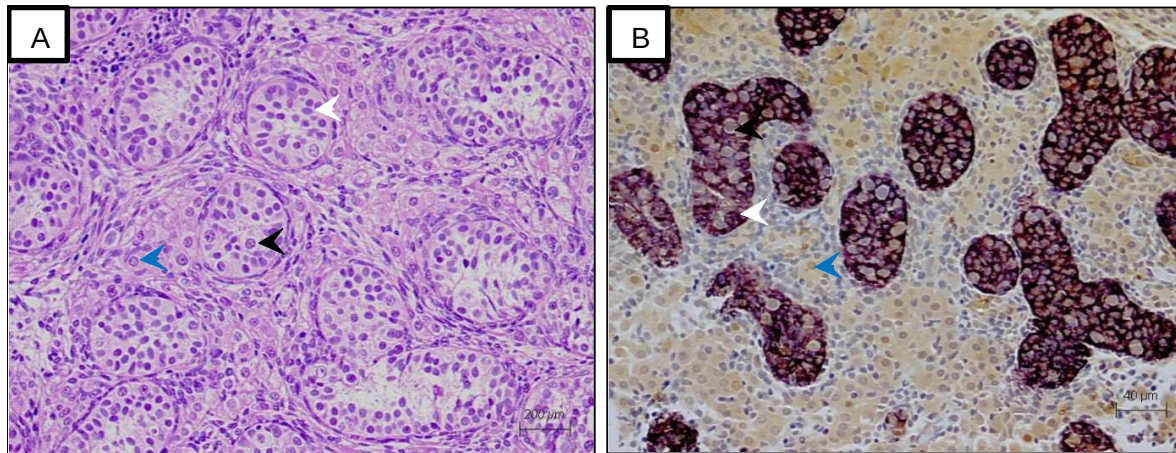


Figure 6 : Coupe de testicule fœtal humain de 16 et 12 semaines de gestation.

A : Coupe de testicule fœtal de 16 SG colorée à l'hématoxyline et à l'éosine. Les cellules de Leydig sont reconnaissables à leur caractère éosinophile. B : Coupe de testicule fœtal de 12 SG après immunomarquage contre l'AMH (violet) et contre la 3-β-HSD (3-β-hydroxy-steroid-deshydrogenase) (marron). Le testicule fœtal est divisé deux compartiments. Les cordons séminifères (cellules de Sertoli (pointes de flèche blanches) et cellules germinales (pointes de flèches noires)) et le tissu interstitiel (cellules de Leydig (pointes de flèche bleues), fibroblastes, macrophages).

Chez l'être humain, on observe 2 à 3 mois après la naissance un pic de sécrétion de testostérone, après la phase de sécrétion des cellules de Leydig fœtales, et avant les cellules adultes (O'Shaughnessy and Fowler, 2011). Certains émettent l'hypothèse d'une troisième population de cellules de Leydig (Prince, 2001). Cependant, ce pic de sécrétion pourrait simplement être du à une réactivation des cellules fœtales.

Les cellules de Leydig se différencient et prolifèrent jusqu'à la 14^{ème} semaine de gestation (O'Shaughnessy et al., 2006). Leur nombre n'évolue plus jusqu'à la 24^{ème} semaine ou il décroît progressivement jusqu'à une nouvelle phase de croissance où apparaissent également les potentielles cellules de Leydig « néonatales » au 2^{ème}/3^{ème} mois après la naissance (Codesal et al., 1990, Prince, 2001). Leur nombre décroît ensuite à nouveau pour laisser place aux cellules de Leydig « adultes ».

La production de testostérone fœtale est nécessaire au développement des canaux de Wolff et à la différenciation du gubernaculum testiculaire qui va permettre la descente du testicule. Cette production s'amorce autour de 6 semaines de gestation et va permettre d'atteindre un pic de testostérone sérique entre la 14^{ème} et la 18^{ème} semaine de gestation. Les pics de production de testostérone sont également observés chez les rongeurs, en fin de vie fœtale

(Habert and Picon, 1984, Livera et al., 2006, O'Shaughnessy and Fowler, 2011). La première phase particulière de sécrétion de testostérone chez l'Homme correspond à ce qui est décrit dans la littérature comme la fenêtre de masculinisation (MPW, masculinization programming window). Décrite chez le rat en 2008 par Welsh et al., cette période correspond à la mise en place de différentes fonctions spécifiques du testicule, telles que l'amorçage de la première phase de descente testiculaire, le développement et la différenciation des canaux de Wolff, du sinus uro-génital et du tubercule uro-génital, ainsi que l'accroissement de la distance ano-génitale (Welsh et al., 2008, Scott et al., 2009) (Fig. 7 et Fig. 8). Cette période, où se mettent en place de nombreuses structures spécifiques de la différenciation mâle est particulièrement sensible aux perturbations endocriniennes.

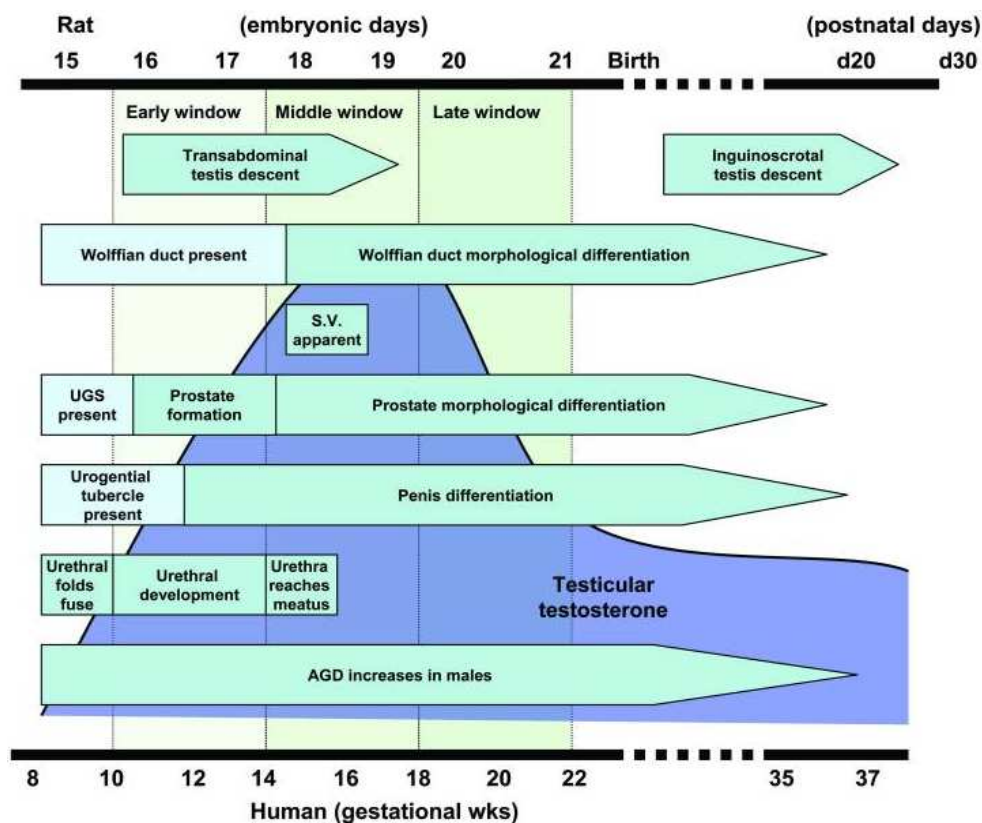


Figure 7 : Fenêtre de masculinisation

Schéma illustrant le développement du tractus uro-génital mâle au cours du temps et sa relation avec le taux de testostérone testiculaire chez le rat et chez l'Homme. (UGS, urogenital sinus, S.V, seminal vesicle) (D'après Welsh et al., 2008)

La deuxième grande fonction des cellules de Leydig fœtales est la sécrétion de l'Insl-3, polypeptide très conservé chez les mammifères (Ivell and Bathgate, 2002) (Fig. 8). L'Insl-3 contrôle la phase trans-abdominale de la descente testiculaire, qui débute au premier trimestre de la grossesse chez l'Homme. Cette phase est suivie au troisième trimestre d'une descente inguino-scrotale qui s'effectue sous le contrôle des androgènes (Ivell and Hartung,

2003, Ivell and Bathgate, 2002). La production d'Insl-3 est régulée par *Sf-1* (Sadeghian et al., 2005, Tremblay and Robert, 2005) et par la testostérone (Lague and Tremblay, 2008). Une étude récente émet l'hypothèse d'un rétrocontrôle de l'Insl-3 induisant la production de testostérone par les cellules de Leydig (Pathirana et al., 2012).

Pendant la vie fœtale, le développement des cellules de Leydig et la sécrétion de testostérone sont en partie régulés par l'axe hypothalamo-hypophysaire et la sécrétion de LH (luteinizing hormone) et de FSH (follicle stimulating hormone). Cependant, il a été décrit que les cellules de Leydig sont capables de se développer et d'être physiologiquement actives de façon indépendante des gonadotropines chez la souris (Huhtaniemi and Pelliniemi, 1992). En effet l'invalidation des récepteurs de la LH et de la FSH ne perturbe pas le maintien du développement des cellules de Leydig fœtales (Migrenne et al., 2001, Zhang et al., 2001). De plus, chez l'Homme, la LH (luteinizing hormone), sécrétée par la glande hypophysaire n'est détectable dans le sérum qu'à la 10^{ème} semaine de gestation chez l'Homme, après le début de la MPW, et donc bien après le début de la phase de production de testostérone (Reyes et al., 1989). Par ailleurs, chez l'Homme, une autre hormone gonadotrope, l'hCG (human chorionic gonadotropin) permet la régulation de la production de testostérone fœtale. Elle agit via le même récepteur que la LH, le LHCGR (luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor). Produite par le placenta dès la 1^{ère} semaine de gestation, elle présente un pic de concentration vers la 10^{ème} semaine (Fowler et al., 1998), puis diminue vers la 12^{ème} semaine (Fowler et al., 2009). Les profils communs entre la sécrétion d'hCG et la production de testostérone suggèrent une régulation stricte de la production de testostérone par l'hormone gonadotrope. Toutefois, plusieurs études suggèrent que l'hCG n'est pas indispensable à la production de testostérone. Chez l'Homme, une mutation du gène codant pour le LHCGR induit, certes, un développement d'organes génitaux externes féminins, mais également un développement partiel du canal déférent et de l'épididyme (Kremer et al., 1995). De même, une mutation de la sous unité beta de la LH entraîne un développement testiculaire normal jusqu'à la naissance, mais une absence de développement post-natal des organes génitaux (O'Shaughnessy and Fowler, 2011). Les hormones gonadotropes ont donc certainement un rôle de régulation et de stimulation de la production de testostérone à des périodes clés du développement testiculaire, mais elles ne sont pas initiatrices du développement des cellules de Leydig et de l'activation de leurs fonctions endocrines.

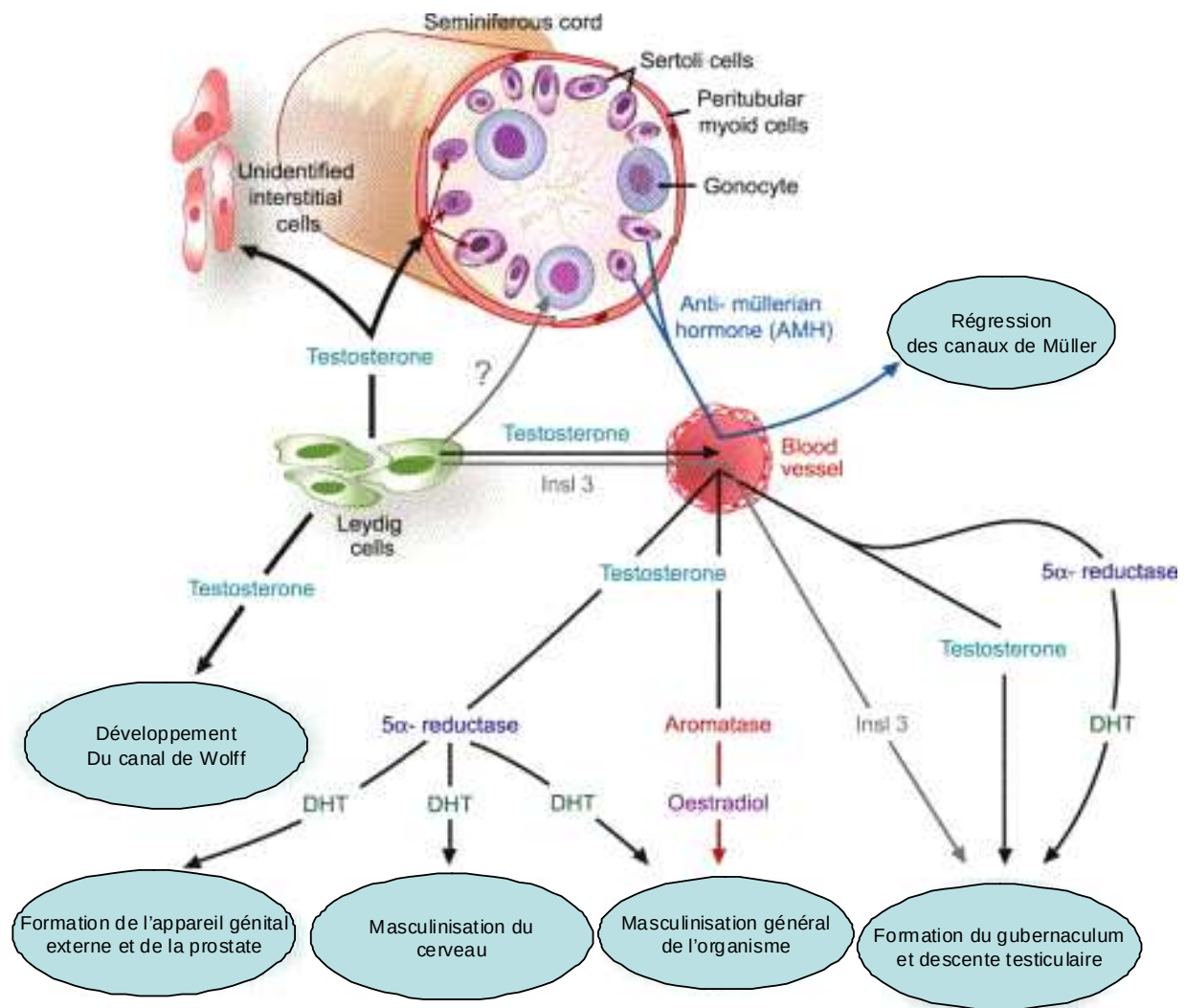


Figure 8 : Fonctions endocrines des cellules somatiques.

Dans le testicule fœtal, les cellules de Sertoli sécrètent l'AMH, qui permet la régression des caractères sexuels féminins. La testostérone et l'Insl3 sont les facteurs sécrétés par les cellules de Leydig qui vont permettre la masculinisation de l'individu (D'après Sharpe, 2006).

I.C.3. Les cellules péritubulaires

Les cellules de Leydig sont les cellules majeures du compartiment interstitiel, cependant d'autres types cellulaires sont représentés, même si peu de données les concernant sont disponibles.

Les cellules péritubulaires myo ides sont les cellules fusiformes qui forment l'assise autour des cordons séminifères. Ces cellules dériveraient du mésonéphros, et il a été décrit que dans un testicule fœtal mis en culture sans mésonéphros, avant la formation des cordons, aucun cordon séminifère ne se formera (Buehr et al., 1993). Ces cellules forment le périmètre des cordons, en partie sous le contrôle de Dhh, sécrété par les cellules de Sertoli, cependant, il est également décrit qu'une gonade XX mise en présence d'un mésonéphros XY développe des cordons séminifères et des cellules portant des marqueurs sertoliens (Tilman and Capel, 1999). Les cellules péritubulaires expriment l' -SMA (α smooth muscle actin), de par leur propriété de cellules du muscle lisse, qui leur confère la capacité contractile nécessaire au transfert des spermatozo ides dans la lumière des tubes séminifères chez l'adulte (Tripiciano et al., 1998).

Dans le tissu interstitiel se développent également des fibroblastes, des cellules h matopo i tiques (lymphocytes, macrophages, cellules plasmatiques, etc.) et des cellules endothéliales. Ces dernières dérivent également du mésonéphros et vont contribuer à la vascularisation spécifique de la gonade fœtale mâle (Martineau et al., 1997).

I.C.4. Les cellules germinales

a. Migration des cellules germinales primordiales

La crête génitale est colonisée par les cellules germinales primordiales (CGPs). Ces cellules sont à l'origine du développement de la lignée germinale et apparaissent très tôt au cours du développement de l'embryon. Leur spécification est décrite chez la souris avant la gastrulation autour de 6 jpc dans la partie postérieure de l'épiblaste. Chez l'Homme, leur origine exacte n'a pas été clairement mise en évidence. Elles sont détectables lors d'une première étape de migration, du passage du mésoderme extra-embryonnaire à l'endoderme du sac vitellin   22 jpc, puis dans le pédicule allantoïdien (Fujimoto et al., 1977, Jirasek, 1971b). Suite à cette phase de migration passive (Pereda et al., 2006), les CGPs migrent alors vers le mésentère dorsal, jusqu'aux crêtes génitales. Au cours de cette migration, les CGPs seront passées de quelques dizaines de cellules à quelques milliers à leur arrivée dans les crêtes génitales 6 SG (Wartenberg, 1989, Francavilla et al., 1990) (Fig. 9).

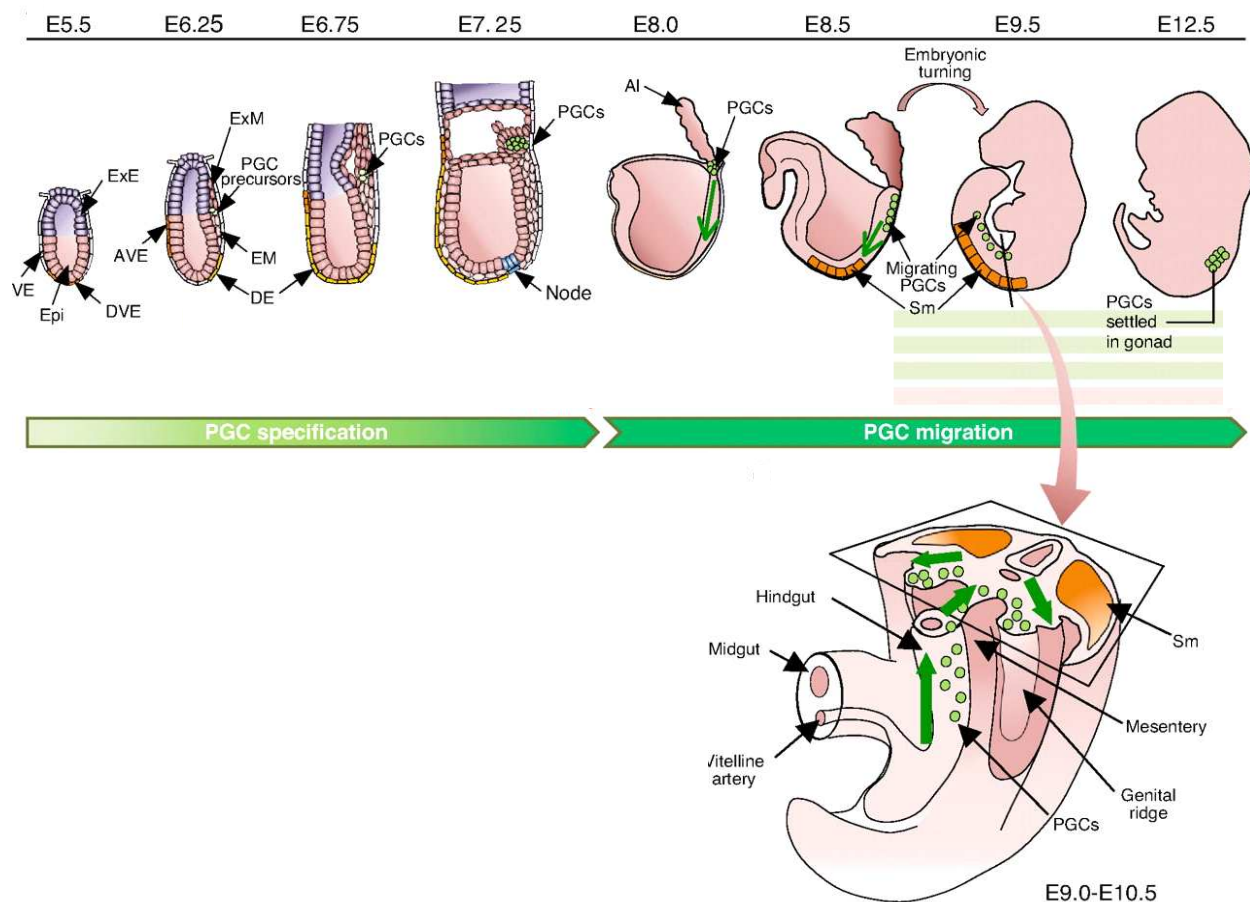


Figure 9 : Parcours migratoire des CGPs lors du développement embryonnaire.

Représentation schématique de la spécification et la migration des CGP. Les CGP sont en vert. Les stades de développement de l'embryon sont indiqués en « embryonic days » (E). Vue détaillée de la migration des CGP dans le tube digestif, à travers le mésentère dorsal jusqu'aux crêtes génitales. La direction des CGP est représentée par les flèches vertes. AI, allantoïde; AVE, endoderme viscéral antérieur; DE, endoderme distal; DVE, endoderme viscéral distal; EM, mésoderme embryonnaire; Epi, épiblaste; ExE, ectoderme extra-embryonnaire; ExM, mésoderme extra-embryonnaire; PGCs, CG primordiales; Sm, somites; VE, endoderme viscéral. (D'après Saitou et al., 2012)

b. Développement des cellules germinales

Chez le mâle, l'évolution des cellules de la lignée germinale peut être divisée en deux grandes phases de développement. Une phase de différenciation en période fœtale et néonatale qui permet la transformation des cellules germinales en spermatogonies, la gamétogenèse, et la deuxième phase, à la puberté, qui consiste en un cycle de développement : la spermatogenèse, symbolisée principalement par les divisions méiotiques qui permettent le développement des spermatogonies en spermatozoïdes (Culty, 2009). Comme indiqué précédemment, dès la 5^{ème} semaine de gestation chez l'Homme, les CGPs colonisent les crêtes génitales et sont détectables par marquage de la PLAP (placental-like alkaline phosphatase) (Cooke et al., 1993, Fujimoto et al., 1977, Jirasek, 1971a). A partir de la colonisation des crêtes génitales, les CGPs sont appelées gonocytes.

Le développement des gonocytes chez la souris et chez le rat est caractérisé par la synchronisation des phases de développement. En effet, les cellules germinales suivent 3 phases consécutives : une première phase de prolifération et apoptose, suivie d'une période de quiescence, et enfin d'une reprise de prolifération et d'apoptose avant la naissance. Tous les gonocytes suivent ce parcours de façon « quasi » simultanée (Olaso and Habert, 2000). L'analyse du profil d'expression des cellules germinales avant, pendant et à la sortie de la phase de quiescence a permis de montrer que l'entrée en phase de quiescence nécessite la régulation de gènes qui contrôlent la transition des cellules en phase G1/S du cycle cellulaire. L'arrêt mitotique s'accompagne d'une régulation de l'état de phosphorylation des protéines de la famille du rétinoblastome (Rb) comprenant p107, p1030 et la pRB, qui sont impliquées dans la régulation de la transition G1/S. En effet, l'arrêt mitotique des cellules germinales en G0/G1 est concomitant avec l'augmentation de l'expression des protéines de la famille INK4 (inhibiteur de cdk4) et Cip/Kip (cdk interacting protein/kinase inhibitory protein) comme p27^{kip1}, p15^{INK4b} dans un premier temps, puis p16^{INK4a}, p21^{Cip1} et p57^{Kip2} ensuite (Spiller et al., 2009). Ces protéines vont inhiber la formation ou l'action des complexes CDK/cyclinesE1/E2, ce qui empêchera la déphosphorylation de la protéine pRB et ainsi la formation du complexe E2F-RB indispensable à la progression des cellules dans le cycle cellulaire ce qui aboutira à l'entrée de ces cellules en phase G0/G1 (Western et al., 2008, Spiller et al., 2009) (Fig. 10).

Chez l'Homme, les cellules germinales ne connaissent pas de développement synchrone, elles expriment des marqueurs différents démontrant des états de différenciation plus ou moins avancés. D'ailleurs, ces différences de développement donnent lieu à des controverses au niveau de la terminologie des cellules germinales fœtales. Selon leur aspect

morphologique ou selon l'expression de marqueurs, plusieurs équipes ont établi leur propre nomenclature. On parle de gonocytes au début de la phase de développement (Clermont and Perey, 1957), puis de prospermatogonie M (pour « multiplying ») apparaissant à 9 semaines de gestation, puis de prospermatogonies T1 (pour « transitional ») à 12 semaines, et de prospermatogonies T2 à 20 semaines (Hilscher and Hilscher, 1976, Wartenberg, 1976). Dans le même temps, Fukuda et al. décrivent 3 types de cellules germinales fœtales : les gonocytes, les cellules intermédiaires à partir de 10 semaines de gestation et les spermatogonies fœtales à partir de la 22^{ème} semaine (Fukuda et al., 1975).

De plus, contrairement à la souris et au rat, une éventuelle phase de quiescence n'a jamais été clairement décrite chez l'Homme. Certaines études indiquent que les prospermatogonies T1 seraient des cellules mitotiquement quiescentes, hypothèse confirmée par l'absence du marqueur de prolifération PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Gaskell et al., 2004, Wartenberg, 1976). Cependant, cette hypothèse est contredite par la présence dans ces mêmes cellules du marqueur Ki67 dont l'expression est caractéristique de toutes les phases du cycle excepté G0 (Pauls et al., 2006). Le développement des cellules étant asynchrone, il est extrêmement difficile de déterminer une phase de quiescence pour un type cellulaire donné (Fig .11).

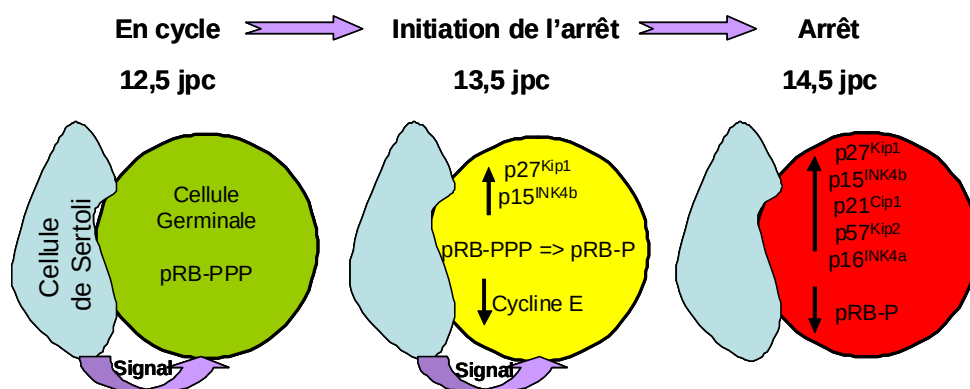


Figure 10 : Protéines du cycle cellulaire impliquées dans l'entrée en quiescence des cellules germinales chez la souris (D'après Western et al., 2008)

A 12,5 jpc, les cellules germinales prolifèrent et présentent une forme hyperphosphorylée de pRB. Elles reçoivent alors un signal extracellulaire qui induit l'initiation de l'arrêt du cycle. A 13,5 jpc, on observe avec l'arrêt mitotique une surexpression de p27^{Kip1} et p15^{INK4b} qui inhibent la phosphorylation de pRB en formant des complexes avec les cyclines E-cdk2 et D-cdk4/6. pRB active alors le checkpoint G1-S permettant l'arrêt mitotique. A 14,5 jpc, toutes les cellules germinales sont en arrêt, toutes les protéines pRB sont hypophosphorylées et commencent à être réprimées puis dégradées.

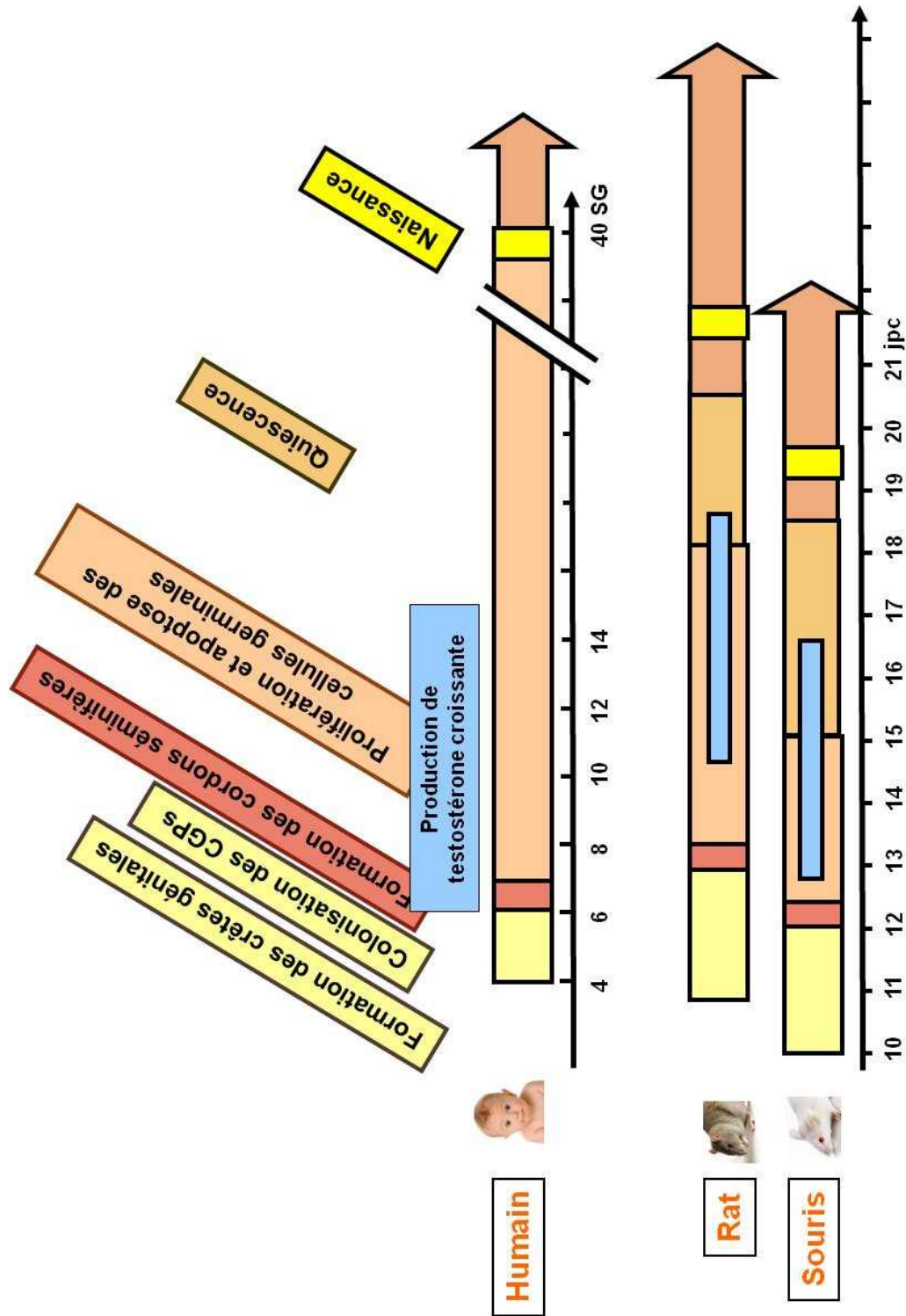


Figure 11 : Chronologie du développement testiculaire chez l'Homme, le rat et la souris

Le développement du testicule fœtal est caractérisé par plusieurs phases primordiales et communes. Le développement chez l'Homme se différencie principalement par l'absence de phase de quiescence des cellules germinales.

c. Le gène *Stra8* et l'induction de la méiose

L'une des différences majeures entre le développement des cellules germinales mâles et celui des cellules germinales femelles est l'initiation de la méiose. Chez le mâle, la méiose démarre à la puberté alors que chez la femelle, la première division méiotique s'effectue en période fœtale. La question du signal d'induction de la méiose dans les cellules germinales se pose depuis plusieurs années. L'un des candidats potentiels au rôle d'initiateur de la méiose est la protéine *Stra8* (stimulated by retinoic acid 8). Le gène *Stra8* a été identifié pour la première fois grâce à sa capacité à être exprimé en réponse à l'acide rétinoïque (Bouillet et al., 1995, Oulad-Abdelghani et al., 1996).

Dans l'ovaire de souris, la méiose débute à 13 jpc. Son initiation est précédée d'une sécrétion d'acide rétinoïque par le mésonéphros adjacent. L'acide rétinoïque entraîne alors dans les cellules germinales de la gonade, une augmentation de l'expression du gène *Stra8*. Ce gène est considéré comme marqueur de l'initiation de la méiose. Il précède l'expression d'autres marqueurs méiotiques tels que *Dmc1*, *Sycp3* ou *Spo11* (Chuma and Nakatsuji, 2001, Anderson et al., 2008). Pourtant, le rôle de *Stra8* dans l'initiation de la méiose n'est pas clairement défini. Plusieurs études réalisées sur des souris mutantes pour le gène *Stra8* ont tenté d'apporter des réponses, mais le phénotype observé diffère selon les études. Dans tous les cas, les souris mutantes sont stériles, mais l'état d'avancement des cellules germinales diffère. Chez la femelle *Stra8* ^{-/-}, les cellules germinales ne présentent aucun marqueur méiotique (*Sycp3*, *Rec8*, *Dmc1*, *Spo11*) (Baltus et al., 2006). Dans le testicule, une étude démontre un résultat similaire à l'ovaire, avec une absence de marqueurs de méiose (Anderson et al., 2008). Une autre étude, sur une autre souche de souris *Stra8* ^{-/-}, décrit que les cellules germinales démarrent leur processus méiotique, puis meurent à un stade plus tardif (Mark et al., 2008). Dans ce dernier modèle, *Stra8* aurait un rôle dans la progression méiotique, plus que dans l'initiation.

Chez le mâle, en période fœtale, l'acide rétinoïque est dégradé par la protéine *Cyp26b1*, inhibant ainsi l'expression de *Stra8* et l'entrée en méiose, jusqu'à la puberté. *In vitro*, le traitement à l'acide rétinoïque de gonades XY au stade indifférencié entraîne l'initiation de la méiose (Ohta et al., 2012, Guerquin et al., 2010, Bowles and Koopman, 2010, Trautmann et al., 2008). Cependant, l'acide rétinoïque et *Stra8* ne sont pas les seuls facteurs indispensables à cette initiation, on observe qu'à 13,5 jpc, la stimulation de *Stra8* par l'acide rétinoïque n'entraîne pas l'entrée en méiose des prospermatogonies (Guerquin et al., 2010).

Il est important de noter que l'induction de l'entrée en méiose des cellules germinales mâles, dans un contexte cellulaire inapproprié, où elles ne doivent pas physiologiquement entrer en méiose, entraîne à moyen terme leur mort par apoptose. Dans des souris invalidées pour les

gènes *Nanos2* et *Cyp26b1*, inhibiteur de méiose dans le testicule, les cellules germinales dégénèrent (Suzuki and Saga, 2008, MacLean et al., 2007). De même, le traitement au RA, qui induit l'augmentation de *Stra8*, entraîne l'apoptose des cellules germinales (Trautmann et al., 2008).

La fonction moléculaire de *Stra8* est très peu décrite. La protéine possède un domaine NLS (nuclear localisation signal) lui permettant d'entrer dans le noyau et un domaine NES (nuclear export signal) permettant sa sortie. *In vivo*, la protéine peut être localisée dans le noyau ou dans le cytoplasme, sans rôle défini pour chacune de ces localisations (Tedesco et al., 2009). Aucun autre domaine connu n'a été décrit pour cette protéine.

II. Le syndrome de dysgénésie testiculaire

Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et de leurs conséquences possibles sur la fonction de reproduction humaine et animale se sont amplifiées. Plusieurs études ont démontré une baisse de la production et de la qualité spermatique au cours du temps chez l'Homme (Bay et al., 2006, Sharpe, 2006). De plus, l'incidence du cancer du testicule augmente de façon régulière. Des données sur les 30 à 50 dernières années ont été rapportées chez des individus en Europe et aux Etats-Unis et indiquent une augmentation de l'incidence du cancer germinal testiculaire de 2 à 4 fois (Richiardi et al., 2004, McGlynn et al., 2003). D'autre part, une augmentation de l'incidence de deux anomalies congénitales des organes génitaux externes a également été rapportée : la cryptorchidie, ou absence de descente testiculaire (Toppari et al., 2001) et l'hypospadias, qui est une altération morphologique de l'urètre (Paulozzi et al., 1997). Ces anomalies de la fonction de reproduction masculine sont regroupées sous le terme de syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) (Skakkebaek et al., 2001, Sharpe and Skakkebaek, 1993).

II.A. Généralités

Plusieurs paramètres permettent de caractériser le déroulement d'une spermatogenèse normale, les principaux étant la mesure à l'âge adulte du nombre, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes. Depuis plusieurs années, des études décrivent un déclin progressif de la qualité de la production spermatique chez l'Homme dans les pays occidentaux. En effet, en Europe du Nord ainsi qu'aux Etats-Unis, le nombre de spermatozoïdes par éjaculat baisse d'environ 1% par an depuis les années 1940 jusqu'à aujourd'hui (Auger et al., 1995, Carlsen et al., 1992, Irvine et al., 1996, Swan et al., 2000, Sharpe, 2010). Une étude très récente réalisée en France sur une cohorte de 26 609 hommes rapporte une diminution encore plus importante du nombre de spermatozoïdes et de la qualité spermatique (Rolland et al., 2012) (Fig. 12). Une augmentation de la fréquence des cancers testiculaires en Europe a également été décrite. Cette fréquence augmente régulièrement de 2 à 4% par an chez l'Homme adulte dans la tranche d'âge de 25 à 40 ans (Toppari et al., 1996). L'augmentation des cancers testiculaire est également décrite dans la population américaine entre 1975 et 2004 (Holmes et al., 2008) (Fig. 13). Dans le même temps, une observation de l'incidence des pathologies congénitales a permis de mettre en évidence une augmentation des cas d'hypospadias et de cryptorchidie dans les mêmes régions (Bay et al., 2006, Skakkebaek et al., 2001).

Ces quatre anomalies, cancer, hypospadias, cryptorchidie et baisse de la qualité spermatique peuvent être corrélées. La cryptorchidie est un facteur de risque pour l'apparition de cancer testiculaire. En effet, la cryptorchidie bilatérale est associée à 10% de risque de développer un cancer testiculaire, contre 1% pour un patient sain (Wood and Elder, 2009). De même, le traitement de la cryptorchidie avant l'âge de la puberté diminue les risques de cancer à l'âge adulte (Akre and Richiardi, 2009, Akre et al., 2009). D'autre part, la cryptorchidie est également un facteur de risque pour l'hypospadias et pour la diminution de la qualité spermatique. Enfin, l'oligospermie augmente les risques d'apparition de cancers testiculaires (Sharpe, 2003).

Ces corrélations ont permis à Sharpe et Skakkebaek de poser l'hypothèse selon laquelle ces différentes anomalies seraient les manifestations symptomatiques d'un même syndrome, le TDS (testicular dysgenesis syndrome), qui aurait pour origine des défauts de développement testiculaire durant la vie fœtale (Sharpe and Skakkebaek, 1993, Sharpe, 2001, Sharpe and Skakkebaek, 2008).

II.B. Les symptômes du TDS et leur origine foetale

La vie fœtale est une période critique de mise en place des deux principales fonctions testiculaires, la stéroïdogenèse effectuée par les cellules de Leydig et la gamétogenèse, qui correspond au développement des cellules germinales avec le soutien des cellules de Sertoli. Une altération de la mise en place de ces deux fonctions fondamentales peut causer à la naissance ou à l'âge adulte, l'apparition de pathologies liées au TDS (Wohlfahrt-Veje et al., 2009).

II.B.1. Hypospadias et Cryptorchidie

L'hypospadias et la cryptorchidie sont deux anomalies du développement de l'appareil génital apparaissant dès la naissance. Ces deux pathologies sont dues à un défaut de production de testostérone (Toppari et al., 2010).

Les organes génitaux internes et externes se développent chez l'Homme à partir de la 8^{ème} semaine de gestation, sous l'influence de la testostérone (Baskin, 2000, Rouiller-Fabre et al., 2008). Un défaut de sécrétion d'androgènes à ce stade de développement peut se traduire par des anomalies de développement des organes génitaux et expliquer l'origine des cas d'hypospadias observables à la naissance (Scott et al., 2009).

Par ailleurs, chez l'Homme, la descente testiculaire s'effectue en deux étapes : une phase trans-abdominale régulée par l'INSL-3, durant le premier trimestre de grossesse, puis une phase inguino-scrotale régulée par la testostérone (Ivell and Anand-Ivell, 2009, Ivell and

Hartung, 2003). Un défaut de production d'androgènes et d'INSL-3 peut donc mener à l'apparition de cas de cryptorchidie à la naissance (Main et al., 2009).

Ces faits ont été confirmés dans plusieurs études expérimentales réalisées chez les rongeurs, dans lesquelles il est démontré qu'une diminution de la production de testostérone en période fœtale entraîne à la naissance l'apparition de ces deux pathologies (Skakkebaek et al., 2001).

II.B.2. Réduction de la production spermatique.

Dés études expérimentales ont démontré qu'une réduction du nombre de cellules germinales et de cellules de Sertoli en période périnatale se traduit à l'âge adulte par une diminution de la production spermatique (Forand et al., 2009, Orth et al., 1988). En effet, chez des souris gestantes exposées aux radiations ionisantes à 17,5 jpc, on observe dans la descendance une diminution de la production spermatique (Forand et al., 2009).

Dans la lignée de souris transgéniques gcd (germ cell deficiency), le même type de phénotype est observé à l'âge adulte. Ces souris ont un déficit de prolifération des cellules germinales primordiales, qui se traduit à l'âge adulte par une diminution drastique du nombre de spermatozoïdes et une stérilité (Lu and Bishop, 2003).

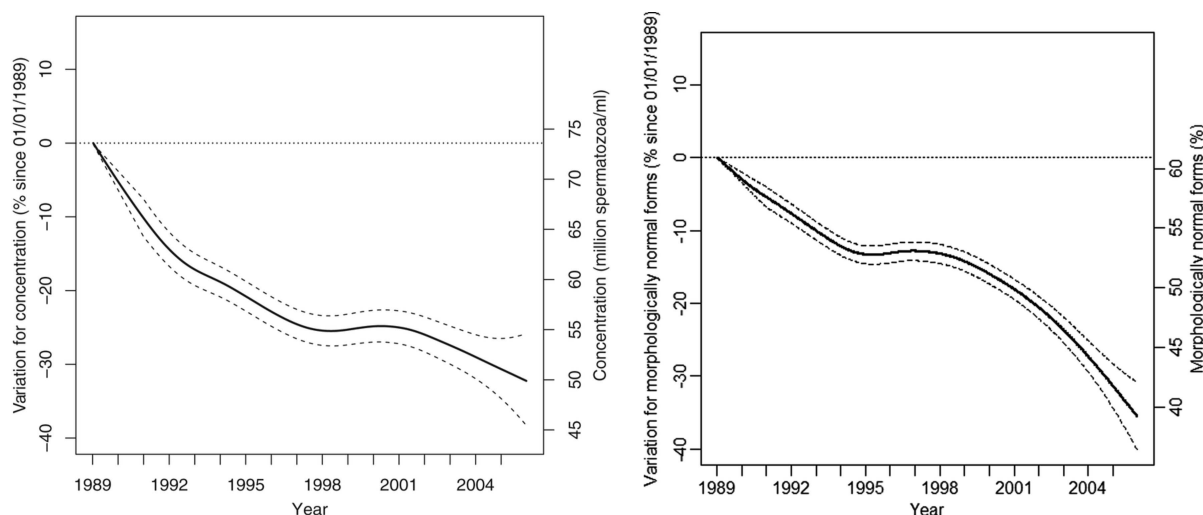


Figure 12 : Evolution du nombre et de la qualité des spermatozoïdes entre 1989 et 2004

Dans une cohorte de 26 609 hommes sains vivant en France métropolitaine, la concentration en spermatozoïdes et le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux est en forte diminution (D'après Rolland et al., 2012).

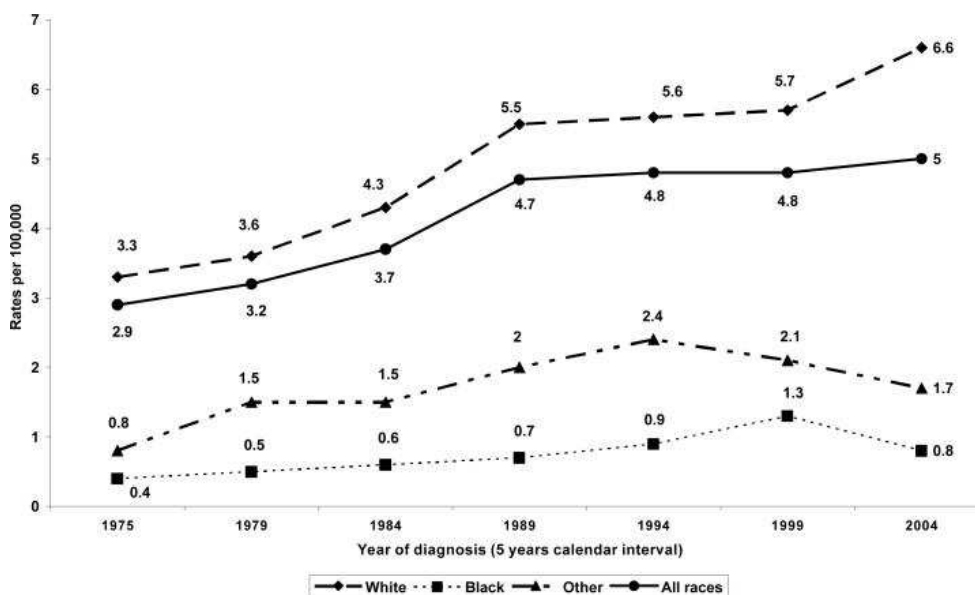


Figure 13 : Evolution de l'incidence des cancers testiculaires entre 1975 et 2004 aux Etats-Unis

Selon les origines ethniques des individus, l'évolution de l'incidence des cancers testiculaires est différente. De façon globale, l'incidence du cancer testiculaire est en augmentation depuis plusieurs années (D'après Holmes et al., 2008).

II.B.3. Cancer testiculaire.

Le cancer du testicule représente environ 1 à 2% des cas de cancers que l'on peut observer chez l'Homme (Parkin et al., 2001). Il présente en revanche une étiologie caractéristique puisque c'est la forme de cancer la plus fréquente chez l'individu jeune avec une incidence maximale située entre 25 et 40 ans et un développement très rare au-delà de 50 ans. Le cancer testiculaire représente à l'heure actuelle la deuxième cause de mortalité chez l'Homme jeune après les leucémies.

Les cancers du testicule dérivent tous d'un même précurseur, le carcinome *in situ* (CIS) ou intra-tubular germ cell neoplasia unclassified (ITGCNU) (Skakkebaek, 1972). Ce type de cancer serait le résultat d'un défaut de différenciation des cellules germinales fœtales, au stade de gonocytes ou de CGPs. Cette hypothèse est soutenue par de nombreux arguments majeurs (Skakkebaek et al., 1987, Rajpert-De Meyts et al., 1998, Rajpert-de Meyts and Hoei-Hansen, 2007, Rajpert-De Meyts, 2006, Kristensen et al., 2008). Le premier argument étant que des cas de CIS ont été détectés dans les testicules de nouveau-nés, suggérant leur formation à un stade encore plus précoce, c'est à dire au cours de la vie fœtale (Rajpert-De Meyts et al., 1998). Outre cette donnée, des similitudes entre les cellules de CIS et les cellules germinales fœtales ont été mises en évidence dans de nombreuses études, aussi bien d'un point de vue morphologique (Albrechtsen et al., 1982, Skakkebaek et al., 1987)

que d'un point de vue immunohistologique. En effet, des marqueurs de cellules germinales fœtales sont retrouvés dans les cellules de CIS alors qu'ils sont absents dans les cellules germinales adultes normales. Le premier marqueur identifié comme présent à la fois dans les cellules germinales fœtales et les cellules de CIS est le marqueur c-kit, récepteur membranaire du stem cell factor (SCF) (Jorgensen et al., 1995, Rajpert-De Meyts and Skakkebaek, 1994). D'autres marqueurs ont été mis en évidence par la suite, tels que NANOG, OCT3/4 ou AP-2γ, trois marqueurs du potentiel souche des cellules germinales (Rajpert-De Meyts, 2006). Une étude transcriptionnelle des cellules germinales fœtales et des cellules du CIS a permis de démontrer que ces deux types cellulaires possèdent deux profils extrêmement semblables. En effet, seuls cinq gènes voient leur profil d'expression modulé entre les gonocytes et les CIS (Sonne et al., 2009). Plus récemment, une étude des profils épigénétiques de ces deux populations cellulaires a mis en évidence une forte similitude entre leurs deux profils et une grande différence avec le profil épigénétique des cellules germinales adultes normales (Almstrup et al., 2010).

II.C. Les causes du TDS

II.C.1. Cause génétique ?

Les causes de l'apparition du TDS n'étant pas clairement définies, l'hypothèse de l'influence génétique n'est pas à exclure. Dans plusieurs cas de cancers testiculaires, une amplification de certaines zones chromosomiques contenant des gènes tels que NANOG, a été fréquemment mise en évidence (Atkin and Baker, 1982, Castedo et al., 1988, Rodriguez et al., 1992). De même, des études ont fait état du polymorphisme de certains gènes étant directement liés à l'apparition de symptômes du TDS. Ainsi une corrélation inverse entre le nombre de CAG de la séquence codante du récepteur des androgènes et une diminution de la production ou de la qualité spermatique a été décrite (Harkonen et al., 2003, Mifsud et al., 2001, Milatiner et al., 2004, von Eckardstein et al., 2001).

Ainsi, la prédisposition génétique est une des causes de l'origine des symptômes du TDS. Différentes études suggèrent également l'implication de modifications épigénétiques par les polluants environnementaux (Skinner et al., 2010).

Les polluants environnementaux étant de plus en plus présents, le facteur environnemental semble également être une cause non négligeable de l'apparition du TDS. Par ailleurs, la possibilité d'une influence environnementale sur un terrain génétiquement favorable est bien sûr également envisageable.

II.C.2. Facteurs environnementaux

Le terme « perturbateur endocrinien » a été établi en 1991 lors de la conférence de Wingspread, réunissant les scientifiques de plusieurs disciplines autour de la question des produits chimiques ayant une influence sur les hormones.

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des composés chimiques exogènes qui se définissent comme des agents, d'origine anthropique ou naturelle, qui interfèrent avec la synthèse, le stockage, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action biologique ou l'élimination des hormones naturelles, responsables du maintien de l'homéostasie des processus du développement et/ou du comportement (Kavlock et al., 1996). En 1996, la commission européenne sur l'environnement définissait un PE comme étant « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrine et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme, ou de ses descendants ou sous population. »

Les premières données faisant état d'une modification des fonctions de reproduction masculine due aux perturbateurs endocriniens proviennent d'analyses de la faune sauvage. L'une des études les plus marquantes est celle de la contamination au DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) du lac Apopka en Floride, dans lequel les alligators mâles ont développé plusieurs altérations. L'étude décrit une diminution du taux de testostérone, l'apparition de micropénis, et une désorganisation testiculaire chez ces alligators, alors que les animaux du lac voisin non contaminé ne présentaient aucune de ces anomalies (Guillette et al., 1994, Guillette and Guillette, 1996). D'autres études ont décrit l'apparition d'anomalies de la fonction de reproduction masculine suite à l'exposition à de fortes doses de produits chimiques, et ceci dans différentes espèces principalement chez les poissons et les oiseaux (Vos et al., 2000, Tian et al., 2012, Matthiessen and Sumpter, 1998, Facemire et al., 1995).

Les études épidémiologiques réalisées chez l'Homme ont permis de faire état d'un lien potentiel entre l'augmentation de la fréquence des anomalies du développement de la fonction de reproduction et l'accroissement de l'utilisation des produits chimiques en tous genres (Slama et al., 2006, Damstra et al., 2002). L'incidence de l'hypospadias est beaucoup plus élevée et en augmentation constante dans les pays industrialisés (Aho et al., 2000, Pierik et al., 2002). De même, une augmentation des anomalies du développement du tractus génital mâle (cryptorchidie et hypospadias) a été enregistrée chez les enfants dont les mères ont été exposées à des polluants sur leur lieu de travail ou sur leur lieu d'habitation (Weidner et al., 1998).

L'influence de composés issus de l'industrie pharmaceutique, et notamment des molécules de synthèse à activité xeno-œstrogénique ou anti-androgénique, est également envisagée. De fait, la constatation d'un potentiel effet délétère des produits à activité xeno-œstrogénique

a été dramatiquement illustrée par les conséquences de l'utilisation du diéthylstilbestrol (DES) entre 1938 et 1971. Ce composé, premier œstrogène de synthèse, a été administré à environ 10 millions de femmes enceintes afin de prévenir les risques d'avortement spontané (Giusti et al., 1995). Son utilisation fût interdite quelques années plus tard suite à l'apparition de lésions chez les enfants des mères ainsi traitées au DES : chez les filles, des malformations au niveau de l'appareil reproducteur, des adénocarcinomes du vagin et du col de l'utérus ainsi que des cas d'infertilité ont été rapportés (Herbst et al., 1971, Palmer et al., 2001) ; chez les garçons, une altération de la qualité du sperme, cryptorchidie, hypospadias, kystes épидидymaires et quelques rares cas de cancer du testicule ont été décrits (Gill et al., 1979, Klip et al., 2002, Palmer et al., 2009, Palmer et al., 2005). Toutefois, ces effets chez les mâles sont controversés (Klip et al., 2002, Palmer et al., 2005).

L'utilisation de plus en plus courante de produits chimiques variés, ayant un caractère de perturbateurs endocriniens ou non et qui se retrouvent en concentration croissante dans l'environnement, semble donc être une des causes majeures de l'apparition du syndrome de dysgénésie testiculaire. Compte tenu de la multiplicité des composés chimiques pouvant ainsi se retrouver répandus dans l'environnement, ce phénomène représente désormais un enjeu de santé publique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux perturbateurs endocriniens utilisés comme plastifiants dans de nombreux produits de consommation courante : le bisphénol A et les phtalates. Un très grand nombre d'arguments expérimentaux et épidémiologiques suggèrent leur implication dans la perturbation du développement testiculaire (Cravedi et al., 2007, Habert et al., 2009, Nordkap et al., 2012, Scott et al., 2009).

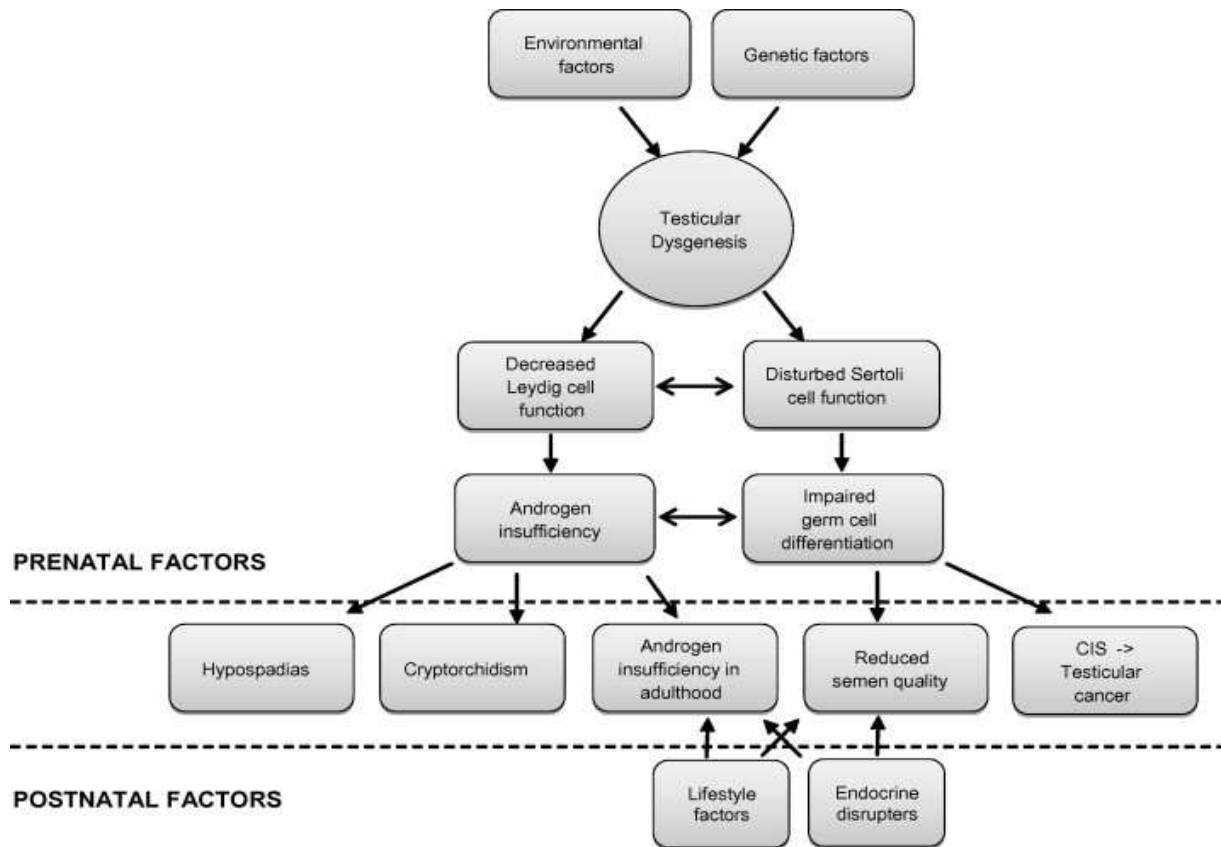


Figure 14 : Liens entre facteurs environnementaux et symptômes du TDS (d'après Nordkap et al., 2012).

Des perturbations fonctionnelles des différents types cellulaires du testicule fœtal peuvent entraîner l'apparition de pathologies liées au TDS.

III. Bisphénol A

III.A. Généralités

Synthétisé en 1891 par le chimiste russe A.P. Dianin, le bisphénol A (BPA, 4,4-dihydroxy-2,2-diphénylpropane) fut d'abord utilisé comme œstrogène de synthèse. La molécule de BPA contient deux groupements phénols et appartient à la famille des diphénylalcane hydroxylés ou bisphénols. Le BPA est produit par une réaction de condensation de l'acétone avec deux phénols, réaction catalysée par l'acide chlorhydrique ou une résine de polystyrène.

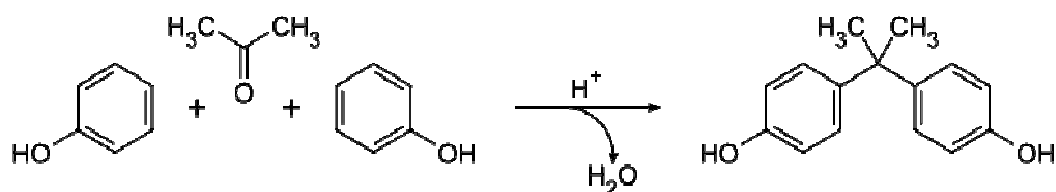


Figure 15 : Formation du BPA

Le BPA est formé par la condensation de l'acétone avec 2 groupements phénols, en milieu acide.

Depuis le début des années 60, le BPA est grandement utilisé dans l'industrie du plastique. En 2006, sa production annuelle dans le monde s'élevait à plus de 3,5 millions de tonnes. Il est utilisé sous forme de polymère dans la production industrielle de polycarbonates de plastiques (71%), de résines époxy (21%), et comme antioxydant ou inhibiteur de polymérisation dans certains plastifiants et dans les PVC (7%).

Les polycarbonates sont utilisés dans la fabrication de nombreux objets de la vie courante (CD, lunettes, amalgames dentaires, bouteilles en plastiques et autres contenants alimentaires). On retrouve les résines époxy dans les revêtements internes de certaines boîtes de conserves et canettes. Le BPA est également utilisé dans le papier thermique constituant certains tickets de caisse (Biedermann et al., 2010) (Fig. 16).

Le BPA est lié de façon non covalente dans ces polymères de plastiques, et peut s'en extraire naturellement en faible quantité, et à des doses plus importantes lorsque le plastique est exposé à une haute température ou en présence de détergents puissants. De plus la libération de molécules semble plus importante lors d'utilisations multiples du contenant. Les utilisateurs de contenants alimentaires à base de BPA sont donc susceptibles d'en ingérer les particules. L'alimentation constitue d'ailleurs la principale source de contamination.

Cependant, étant présent dans de nombreux produits ainsi que dans les poussières domestiques (Loganathan and Kannan, 2011), le BPA pénètre également dans l'organisme par voie dermique et par inhalation. D'après, une étude réalisée sur une cohorte du National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) des traces de BPA sont détectées dans l'urine de plus de 93% de la population américaine (Calafat et al., 2008).

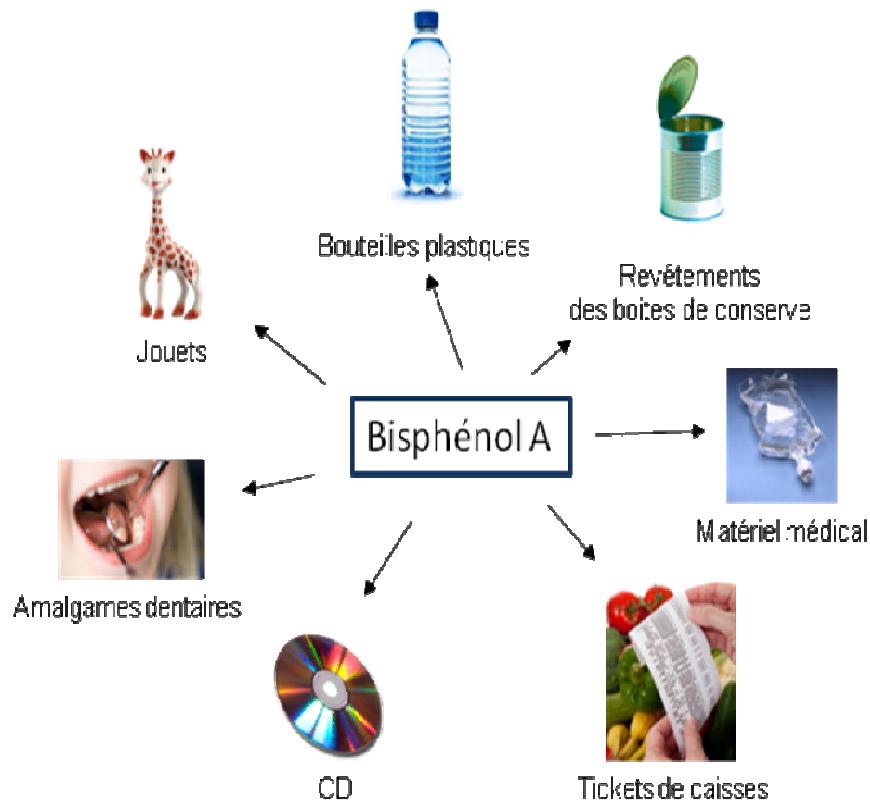


Figure 16 : Potentielles sources d'exposition au BPA

Le BPA est un plastifiant retrouvé dans de nombreux produits de consommation courante (bouteille plastique, intérieur des boîtes de conserve, poche de perfusion etc...)

Le BPA fait l'objet de nombreux débats quant à sa toxicité pour l'Homme. En effet, la molécule a été synthétisée et étudiée au début du XX^{ème} siècle en tant qu'œstrogénomimétique. Comme le diethylstilbestrol (DES), autre molécule de synthèse, le BPA partage certaines propriétés de l'œstradiol (E2), principal œstrogène synthétisé chez l'Homme.

Or, le DES, utilisé comme médicament jusqu'au milieu des années 70 s'est avéré extrêmement nocif. De part ses propriétés œstrogéniques, le DES entraîne des dérèglements hormonaux et les anomalies génitales précédemment décrites (Toppari et al., 1996, Delbes et al., 2006).

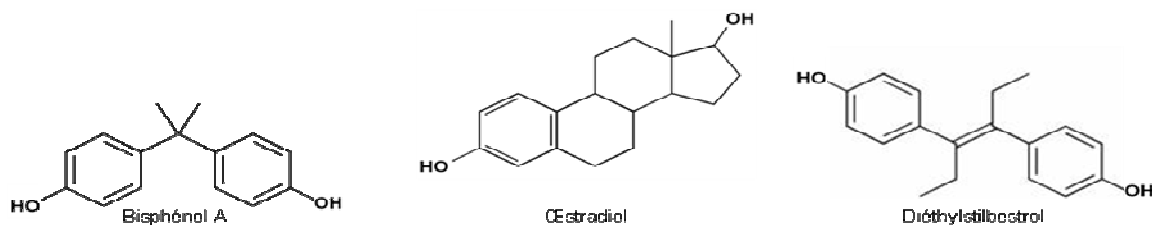


Figure 17 : Formule semi-développée de la structure générale du bisphénol A, de l'œstradiol et du diéthylstilbestrol

Aujourd'hui, le BPA, fait l'objet de nombreuses études expérimentales et épidémiologiques afin de définir de façon précise son degré de toxicité. Plusieurs études réalisées chez les rongeurs font état d'effets toxiques du BPA à forte dose sur différents organes comme le foie, la prostate, les seins, et particulièrement sur la fonction de reproduction (Expertise collective de l'INSERM : BPA, Effets sur la reproduction, 2011). Ceci a amené les agences de sécurité sanitaire à définir une dose sans effet toxique observable (NOAEL, no observable adverse effect level) de 5 000 µg/kg/jour et une dose journalière admissible (DJA) de 50 µg/kg/jour (Expertise collective de l'ANSES : Effets sanitaires du BPA). A partir de ces données, des décisions gouvernementales ont été prises quant à l'interdiction de l'utilisation du BPA dans la fabrication de contenants alimentaires. Le Canada fut le premiers pays à voter l'interdiction du BPA dans les biberons, en octobre 2008. La France interdit la commercialisation de biberons contenant du BPA en juin 2010 dans la Loi Grenelle 2, suivie par l'Union Européenne en novembre 2010, qui en interdit la fabrication, la vente et l'importation depuis juin 2011. La France tente d'aller plus loin, en votant récemment un projet de loi menant à la suspension de la fabrication et commercialisation des emballages de produits contenant du BPA destinés aux enfants de moins de 3 ans, dès 2013, et à partir de 2015, cette suspension viserait également la fabrication et la commercialisation de tout conditionnement en contact avec des aliments. Ce projet de loi fait actuellement l'objet de discussions au Sénat, et de nombreux débats avec les industriels, contraints de trouver rapidement des substituts.

Le principe de précaution est appliqué, néanmoins la toxicité réelle du BPA fait encore l'objet de nombreuses questions, car les études expérimentales réalisées sur les rongeurs sont parfois contradictoires, et ne permettent pas d'extrapoler sur une éventuelle toxicité pour l'Homme. De plus, la plupart des études sont réalisées en utilisant de fortes concentrations de BPA, mais d'autres mettent en évidence des effets différents, à faible concentration.

Plusieurs études épidémiologiques tentent d'établir des liens entre l'exposition au BPA et l'apparition de certaines pathologies. Cependant, il est difficile d'établir des liens de cause à effet pour une molécule à laquelle nous sommes exposés de façon chronique. En effet, le

BPA est éliminé de façon rapide par l'organisme, mais sa présence ubiquitaire dans les objets de consommation courante maintient des taux de BPA non négligeables dans l'organisme. Ainsi, on le retrouve dans tous les fluides biologiques (sang, urine, lait maternel...), à des taux qui peuvent être très variables d'un individu à l'autre (Vandenberg et al., 2010).

III.B. Métabolisme et toxicocinétique

La dangerosité du BPA pour l'organisme dépend de plusieurs paramètres en plus de la dose d'exposition : sa diffusion, sa prise en charge par les enzymes de détoxification, les processus d'élimination permettent d'évaluer dans quelle mesure le BPA est toxique.

Dès son ingestion, le BPA est totalement pris en charge par le système digestif et absorbé. Une fois absorbé, le BPA est rapidement distribué dans tous les tissus sans affinité particulière pour un tissu donné. Le taux plasmatique maximal est atteint environ 80 min après administration d'une dose de BPA (Volkel et al., 2002). Les enzymes de biotransformation intestinales et hépatiques qui interviennent classiquement dans les processus de conjugaison des xénobiotiques, telles que les UDP-glucuronyl-transférases et les sulfotransférases sont capables de le métaboliser en une forme conjuguée (Volkel et al., 2002, Inoue et al., 2003, Pottenger et al., 2000).

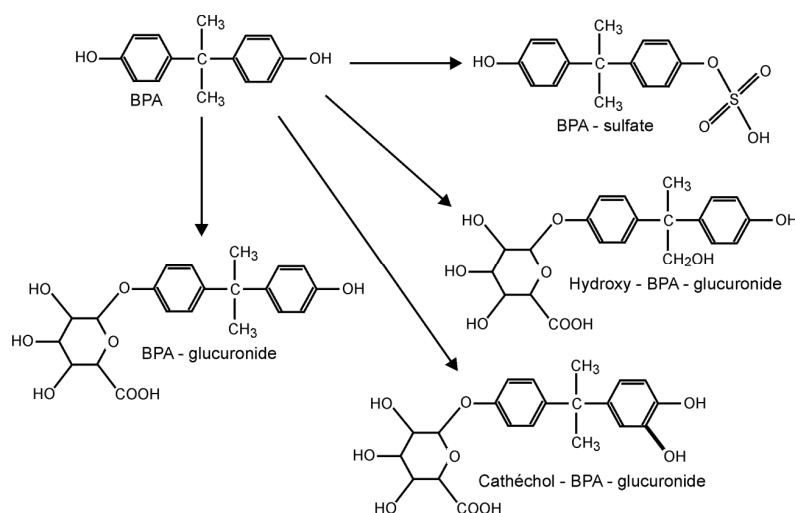


Figure 18 : Représentation schématique des voies principales de transformation du BPA.

Le BPA est transformé par les sulfotransférases en BPA sulfate ; par les UDP-glucuronyl-transférases en BPA-glucuronide, hydroxy-BPA-glucuronide ou Catéchol-BPA-glucuronide. Ces réactions sont réversibles. (D'après l'Expertise collective de l'INSERM : BPA, Effets sur la reproduction, 2011.)

Le BPA-glucuronide constitue la forme majoritaire chez l'Homme, mais on retrouve également le BPA sous sa forme libre. Les formes conjuguées ne possèdent pas les mêmes propriétés que la forme libre, qui est la forme active du BPA (Lacroix et al., 2011). Seul le BPA libre est capable de se lier aux récepteurs des œstrogènes (Matthews et al., 2001). Par ailleurs, la présence dans certains organes, d'enzymes de déconjugaison de type β -glucuronidase ou arylsulfatase, permet de retransformer le BPA sous sa forme libre. D'après Volkël et coll. et Teeguarden et coll., le taux de BPA libre sanguin représenterait moins d'1% du BPA total (Volkel et al., 2002, Teeguarden et al., 2011). D'autres études de monitoring publiées par Ye et coll. ou par Kim et coll. indiquent des taux urinaires allant de 10 à 30% de BPA libre (Ye et al., 2005, Kim et al., 2003).

Une fois absorbé, le BPA est rapidement éliminé dans l'urine. Chez l'Homme, le BPA possède une demi-vie de 4 à 6h (Volkel et al., 2005, Volkel et al., 2002), cependant les études de toxicocinétique sont difficilement exploitables compte tenu de l'exposition quasi continue à laquelle nous sommes soumis. Des études de pharmacocinétique sont également réalisées chez les rongeurs, mais elles ne permettent pas d'extrapolation à l'Homme, car il existe d'importantes différences inter-espèces dans les mécanismes de détoxification et d'élimination. La présence d'un cycle entéro-hépatique chez le rat entraîne la libération de BPA-glucuronide dans la bile, suivie d'une réabsorption avant d'être définitivement éliminé (Upmeier et al., 2000, Kurebayashi et al., 2003). La demi-vie du BPA chez le rat serait comprise entre 24 et 48 heures, temps de diffusion beaucoup plus long que chez l'Homme.

Chez le nouveau né, les voies métaboliques, notamment la voie de la glucuronidation, ne sont pas entièrement fonctionnelles. Les rapports BPA libre/BPA conjugué ne sont pas les mêmes qu'à l'âge adulte. De plus, différentes études ont relevé des taux de BPA, libre et conjugué, dans le plasma fœtal, indiquant un passage placentaire (Vandenberg et al., 2007). En outre, les enzymes de déconjugaison apparaissent avant les enzymes de conjugaison dans le développement. Au niveau fœtal, l'équilibre se déplace davantage vers une augmentation du taux de BPA libre par rapport au BPA conjugué (Nishikawa et al., 2010). Une attention particulière doit donc être portée sur l'exposition des fœtus et des nouveau-nés.

III.C. Taux d'exposition de la population

Le niveau d'exposition réelle des populations au BPA fait l'objet de nombreuses interrogations. Déterminer les niveaux de BPA auxquels la population est exposée permet de mesurer la pertinence des études expérimentales réalisées en laboratoire. Afin d'évaluer le taux de contamination au BPA, plusieurs mesures ont été effectuées dans différentes

cohortes aux Etats-Unis, en Europe et en Asie du sud-est. Les données principales concernent les taux de BPA retrouvées dans le sang, après absorption par le système digestif et dans l'urine après son élimination.

Les résultats sont extrêmement variables d'une étude à l'autre, ceux-ci dépendants de la population étudiée (localisation, origine, sexe, âge), mais aussi de la méthode de mesure. Le dosage ELISA et la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS, GC/MS) sont les principales méthodes utilisées. Depuis 2001, plus d'une vingtaine d'études mesurant le taux de BPA urinaire chez des adultes sains ont été publiées, avec des valeurs maximales atteignant 10^{-6} M.

	Masse volumique de BPA total (ng/mL)	Concentration molaire de BPA total (M) (valeur moyenne)	Références
Sang	ND à > 2 0,2	ND à > $8,7 \cdot 10^{-9}$ $8,7 \cdot 10^{-10}$	Kaddar et al., 2009 He et al., 2009
Urine	1,1 2,4 2,8	$4,8 \cdot 10^{-9}$ $1,1 \cdot 10^{-8}$ $1,1 \cdot 10^{-8}$	Schöringhumer et Cichna-Markl, 2007 Calafat et al., 2008 Kim et al., 2012

Tableau 3 : Taux moyens de BPA total retrouvés dans le sang et l'urine d'individus adultes sains

Après prélèvement de sang et/ou d'urine, les taux de BPA ont été mesurés par spectrométrie HPLC ou par dosage ELISA

Les études les plus récentes réalisées sur de larges cohortes d'individus, révèlent dans le sang et l'urine, des valeurs moyennes de BPA variant entre 10^{-9} M (limite de détection d'après la plupart des études) et 10^{-8} M.

Ces valeurs représentent les concentrations de BPA total, sous ses formes conjuguée (principalement glucuronidées et sulfatées) et déconjuguée. Une étude réalisée par Kim et al. en 2003 rapporte chez l'Homme une composition urinaire de 29,1% de BPA libre, 66,2% de BPA-glucuronide et 4,78% de BPA-sulfate, et chez la femme, 33,4% de BPA libre, 33,1% de BPA-glucuronide et 33,5% de BPA sulfate (Kim et al., 2003). Néanmoins, de vifs débats remettent en cause les données répertoriées à ce sujet. Dans une étude récente, les valeurs de BPA libre dans le sang sont rapportées entre 0,2 et 1,2% du BPA total, ce qui correspond à des valeurs inférieures à 10^{-10} M (Teeguarden et al., 2011). Le BPA conjugué étant biologiquement inactif, il est important de mesurer les taux de BPA libre retrouvés dans

l'organisme et les études les plus récentes s'intéressent distinctement aux mesures de BPA sous ses différentes formes (Fenichel et al., 2012, Vandenberg et al., 2010).

Les fœtus et nouveau-nés étant des cibles particulières de la perturbation endocrinienne, nous nous intéresserons principalement aux valeurs relevées en période de grossesse. Des données sont rapportées concernant les taux de BPA libre dans le sang chez la femme enceinte, dans le liquide amniotique, le placenta, le lait maternel ainsi que dans le sang de cordon ombilical.

	Masse volumique de BPA libre (ng/mL)	Concentration molaire de BPA libre (M) (valeur moyenne)	Références
Sang maternel à l'accouchement	9 5,9	4.10^{-8} $2,6.10^{-8}$	Lee et al., 2008 Padmanabhan et al., 2008
Lait maternel	1,9	$8,3.10^{-9}$	Ye et al., 2006
Liquide Amniotique	0,6	$2,4.10^{-9}$	Engel et al., 2006
Sang de cordon ombilical	1,13 0,9	5.10^{-9} $3,9.10^{-9}$	Lee et al., 2008 Fénichel et al., 2012

Tableau 4 : Taux moyens de BPA libre retrouvés en période de grossesse dans différents fluides biologiques

Dans différents fluides biologiques, les taux de BPA ont été mesurés par spectrométrie HPLC ou par dosage ELISA

Ces données concernant le liquide amniotique et le sang de cordon ombilical montrent que le BPA libre traverse la barrière placentaire et le fœtus est alors exposé à des concentrations de BPA relatives à l'exposition de la mère.

Par ailleurs, des relevés ont été effectués chez de jeunes enfants de moins de 11 ans. Cette population d'enfants étant susceptibles de porter les objets à leur bouche et étant souvent au sol au contact de poussières, on retrouve dans leur urine des concentrations de BPA jusqu'à 5 fois plus importantes que chez les adultes (Becker et al., 2009, Calafat et al., 2008).

III.D. Toxicité du Bisphénol A sur l'organisme

Plusieurs études épidémiologiques ont tenté d'établir des corrélations entre les taux d'exposition au BPA et l'apparition de certaines pathologies. De nombreuses études expérimentales effectuées chez l'animal font d'ores et déjà état d'effets délétères sur le

fonctionnement de différents organes. Des dysfonctionnements dus au BPA sont suspectés au niveau du cerveau, du système cardiovasculaire, de la thyroïde, du système immunitaire ou de l'intestin (Expertise collective de l'ANSES : Effets sanitaires du BPA, sept. 2011). Nous nous sommes concentrés sur les dérèglements observés sur les organes liés à la fonction de reproduction.

Les doses de BPA utilisées, les méthodes et voies d'administration, les périodes d'exposition, les espèces et souches d'animaux sont autant de critères qui varient d'une étude à l'autre. Par conséquent, la transposition à l'Homme reste toujours difficile, mais il convient de rester attentif vis-à-vis des résultats observés dans ces études expérimentales réalisées chez l'animal. L'un des critères majeurs dans l'étude des effets reprotoxiques étant la période d'exposition, nous avons focalisé notre étude sur l'exposition prénatale et périnatale au BPA.

III.D.1.Effets du BPA sur la fonction de reproduction mâle

III.D.1.1. Etudes expérimentales chez l'animal

Chez l'animal, des dizaines d'études expérimentales ont été réalisées afin de déterminer la toxicité du BPA sur les fonctions de reproduction masculine (Expertise collective de l'INSERM : BPA, Effets sur la reproduction). Les résultats sont contradictoires en fonction des modèles étudiés.

a. Exposition en période gestationnelle et postnatale

De nombreuses études sont référencées concernant l'exposition au BPA en période fœtale. Pour la plupart, l'exposition est poursuivie pendant la période de lactation. Les principaux paramètres étudiés sont les taux de sécrétions hormonales à l'âge adulte et la qualité de la production spermatique. Certaines études retrouvent des effets délétères, d'autres non.

Chez le rat, Salian et al. ont effectué une étude sur des rats Holtzman exposés au BPA de 12 jpc à 21 jpp à 1,2 et 2,4 µg/kg/jour. Les mâles F1 sont observés, puis accouplés à 75 jpp et les générations F2 et F3 sont également étudiées. On observe dans la génération F1 une augmentation des pertes post-implantatoires, une diminution de la taille des portées, du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes. Les taux d'hormone à l'âge adulte sont également diminués (FSH, LH, testostérone, œstradiol). On observe également une diminution de l'expression d'ERβ et du récepteur des androgènes, dans les 3 générations. Ces effets persistants sur plusieurs générations suggèrent une action du BPA sur la reprogrammation épigénétique des cellules germinales (Salian et al., 2009b).

Dans plusieurs études réalisées chez le rat, la distance ano-génitale (AGD), marqueur de masculinisation a été mesurée après traitement au BPA à différentes doses. Une étude démontre une réduction de l'AGD après administration de 250 µg/kg/jour de BPA (Murray et al., 2007) alors que deux autres études indépendantes ne montrent aucun effet sur l'AGD aux doses de 4 000-40 000 µg/kg/jour et 1-50 000 µg/kg/jour respectivement (Kobayashi et al., 2002, Tyl et al., 2002).

A contrario, Howdeshell et al. démontrent une absence d'effet de l'exposition au BPA en période foétale à des doses de 2 à 200 µg/kg/jour chez des rats Long-Evans. Dans cette étude, le BPA n'influe pas sur les niveaux d'hormones, ni sur la production spermatique (Howdeshell et al., 2008). De même, une étude précédente réalisée par Tinwell et al. sur des rats Wistar et sur des Sprague-Dawley ne montre aucun effet du BPA aux doses de 20 et 100 µg/jg/jour, sur la fonction de reproduction mâle (Tinwell et al., 2002).

De façon étonnante, une étude de Watanabe et al. démontre des effets encore différents. Chez des rats Sprague-Dawley exposés à de fortes doses de BPA (4 à 400 mg/kg/jour) de 6 jpc à 20 jpp, une augmentation significative du taux de testostérone est observée (Watanabe et al., 2003).

Dans une étude réalisée sur des souris CD-1, le BPA n'est pas administré par gavage, mais de façon chronique par des implants sous-cutanés contenant 100 ou 5 000 µg de BPA, pendant les périodes de gestation et lactation. Les souris sont sacrifiées à 28 jpp. Le poids des organes reproducteurs n'est pas modifié par le traitement. En revanche, on observe une diminution du pourcentage de tubes séminifères contenant des spermatides matures (Okada and Kai, 2008).

Espèce	Doses	Période d'exposition	Effets	Références
Rat Long Evans	2-20-200 µg/kg/jour	7jpc à 18 jpp	Aucun effet sur le poids des organes du système reproducteur ni sur la réserve spermatique	Howdeshell et al., 2008
Rat Holtzmann	1,2 et 2,4 µg/kg/jour	12jpc à 21jpp	↓ Taille des portées ↑ des pertes post-implantatoires et du délai d'accouplement ↓ nombre et mobilité des spermatozoïdes ↑ poids corporel F2 et F3 ↓ expression d'ERβ testiculaire ↓ expression d'AR testiculaire en F1	Salian et al., 2009
Rat Sprague-Dawley	4-40-400 mg/kg/jour	6jpc à 20jpp	↑ taux de testostérone à 9 semaines	Watanabe et al., 2003
Rat Sprague-Dawley	20-100-50000 µg/kg/jour	6jpc à 21jpp	↓ réserve spermatique (à 50 mg/kg/jour uniquement)	Tinwell et al., 2002
Rat	4 000 à 40 000 µg/kg/jour	gestation et lactation	Aucun effet sur la distance ano-génitale	Kobayashi et al., 2002
Rat Sprague-Dawley	1 à 50 000 µg/kg/jour	gestation et lactation	Aucun effet sur la distance ano-génitale	Tyl et al., 2002
Souris CD-1	100 à 5 000 µg	gestation et lactation	↓ tubes séminifères contenant des spermatides matures	Okada et Kai, 2008
Rat Holtzmann	100 à 1600 µg/kg/jour	1 à 5 jpp	↓ réserve spermatique épididymaire ↓ mobilité des spermatozoïdes ↓ expression de connexine 43	Salian et al., 2009
Rat Sprague-Dawley	2 à 9700 µg/kg/jour	1 à 9 jpp	Aucun effet sur la reproduction (hormones et gènes testiculaires)	Kato et al., 2006

Tableau 5 : Effets du BPA sur le testicule de rongeur après traitement en période fœtale et/ou postnatale.

Le BPA est administré par gavage ou implants pendant différentes périodes de la gestation et les effets sont observés à la naissance et à l'âge adulte.

b. Exposition néonatale

Une autre étude a été réalisée par Salian et al. en 2009 sur des rats Holtzman traités pendant 5 jours à partir de la naissance à des doses de BPA variant de 100 à 1600 µg/kg/jour, puis observés à l'âge adulte. Une diminution de la réserve spermatique épидидymaire ainsi que de la mobilité des spermatozoïdes est observée. Une diminution de la taille des portées est également observée. Cette étude démontre aussi des effets sur les cellules somatiques ; le BPA diminuerait le taux d'expression de la protéine d'adhésion cellulaire, la connexine 43, dans les cellules de Sertoli (Salian et al., 2009a).

Auparavant, dans une étude de Kato et al., des rats Sprague-Dawley avaient été traités de la naissance à 9 jpp à des doses de 2 et 9 700 µg/kg/jour. Il n'est rapporté aucun effet du BPA sur la fonction de reproduction, ni au niveau hormonal, ni sur l'expression de gènes testiculaires (Kato et al., 2006).

Les résultats des différentes études étant largement contradictoires, il est difficile de tirer une conclusion quant à la toxicité du BPA sur la fonction de reproduction chez le mâle, et impossible de tenter d'extrapoler ces résultats à de potentiels effets sur l'espèce humaine.

Cependant, des études épidémiologiques, le plus souvent chez l'adulte, ont été réalisées afin de tenter de mettre en évidence des relations entre les taux d'exposition au BPA et l'apparition d'anomalies de la fonction de reproduction.

III.D.1.2. Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques comportent elles aussi différents biais, le plus important étant la contamination chronique au BPA et son élimination rapide. Il est difficile d'établir des liens directs entre le relevé d'un taux de BPA à un moment donné et une anomalie particulière.

Plusieurs études ont néanmoins réussi à corréler statistiquement l'exposition au BPA et des troubles de la fonction sexuelle.

Une étude de Li et al. a été réalisée parmi des hommes étant professionnellement exposés au BPA au quotidien. Les taux de BPA ont été relevés dans l'urine, puis les éventuels troubles de la fonction sexuelle ont été estimés par des réponses à un questionnaire (Li et al., 2011). Les auteurs concluent qu'un lien entre l'exposition au BPA et une augmentation des troubles de la fonction sexuelle existe, cependant, cette conclusion ne reste qu'une

hypothèse étant donné le mode opératoire utilisé, les réponses à un questionnaire laissant forcément place à une part de subjectivité.

De même, Mendiola et al. observent dans une population d'hommes sains une diminution de la quantité de testostérone libre liée à l'augmentation du taux de BPA urinaire (Mendiola et al., 2010).

A l'inverse, d'après l'étude sur la cohorte InCHIANTI (adultes sains), le taux de testostérone sérique augmenterait avec le taux de BPA urinaire (Galloway et al., 2010).

Afin de mettre en évidence des effets d'une exposition au BPA en période fœtale, deux études ont mis en relation des critères de masculinisation observables à la naissance et l'exposition préalable au BPA :

En Chine, les taux de BPA ont été relevés dans une cohorte de parents, puis l'AGD de leurs nouveau-nés a été mesurée. D'après cette étude, l'AGD serait plus faible chez les enfants dont les parents ont été plus exposés au BPA (Miao et al., 2011). En revanche, dans une autre étude récente, Fénichel et al. ont mesuré au sein d'une cohorte, les taux de BPA dans le sang de cordon ombilical puis ont étudié l'apparition de cas de cryptorchidie. Aucun lien n'a été établi entre le taux de BPA et l'incidence de cette pathologie (Fénichel et al., 2012).

III.D.1.3. Effets du BPA sur d'autres organes impliqués dans la fonction de reproduction masculine

a. BPA et cancer de la prostate

Dans la majorité des pays occidentaux, le cancer de la prostate est le cancer ayant la plus grande incidence chez l'homme. Plusieurs études ont démontré l'influence de composés œstrogéniques comme l'ethynil-œstradiol ou le diéthylstilbestrol sur la taille de la prostate chez les rongeurs.

La première étude s'intéressant aux effets du BPA sur la prostate a été publiée en 1997. Les auteurs indiquent qu'après administration orale de 2 et 20 mg/kg/jour *in utero*, le BPA induit dans des souris CF-1, une augmentation de la taille de la prostate à l'âge adulte (Nagel et al., 1997).

Par la suite, aucun effet du BPA n'a été retrouvé dans les études transgénérationnelles effectuées sur le poids de la prostate de rats Sprague-Dawley et souris CD-1 (Tyl et al., 2008, Tyl et al., 2002). En revanche, un traitement au BPA de souris BALB/c en période

foétale de 13 à 18 jpc entraîne l'augmentation de l'expression de la cytokératine 10, protéine associée à l'apparition de néoplasie de l'épithélium prostatique (Ogura et al., 2007).

Dans une autre étude, un traitement en période néonatale de rats Sprague-Dawley induit la modification du niveau d'expression d'une trentaine de gènes, dont la phosphodiésterase 4D, impliquée dans les phénomènes de méthylation. Le maintien de son expression est susceptible de modifier la mémoire épigénétique de la prostate (Ho et al., 2006). D'après la même équipe, un traitement néonatal au BPA, suivi d'injections d'œstradiol ou de testostérone à l'âge adulte entraîne l'apparition de lésion précancéreuses prostatiques (Leav et al., 1988). Ceci suggère l'implication du BPA dans la programmation du développement de la prostate pouvant mener à des cancers en cas de dérèglement hormonal à l'âge adulte.

III.E. Mécanisme d'action

III.E.1. Les récepteurs classiques des oestrogènes

Les mécanismes d'action du BPA sont peu connus. Perturbateur endocrinien œstrogenomimétique, il est capable de se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes mais avec une faible affinité, 10 000 fois inférieure à celle de l'œstradiol (Kuiper et al., 1998). Deux isoformes des récepteurs aux œstrogènes ont été caractérisées et appelées respectivement ER α et ER β (Kuiper et al., 1996, Koike et al., 1987, Green et al., 1986). Elles sont codées par deux gènes différents nommés NR3A1 (Nuclear Receptor 3A1) pour ER α et NR3A2 (Nuclear Receptor 3A2) pour ER β . L'expression de ces deux récepteurs dans le testicule varie en fonction de l'espèce et du stade de développement.

Dans le testicule foetal, les ARNm de ER α et ER β sont présents dans la gonade foetale des rongeurs pendant toute la période du développement foetal (Williams et al., 2001). Les études immunohistochimiques ont montré que ER α commence à être exprimé dans les cellules de Leydig et les cellules péricubulaires à partir de 11,5 jpc jusqu'à la naissance alors qu'il est absent des cellules germinales pendant toute la vie foetale (Nielsen et al., 2000, Greco et al., 1992). ER β est exprimé dans la gonade des rongeurs (rat et souris) à partir de 14,5 jpc dans les cellules germinales (Jefferson et al., 2000). Chez le rat, il est également exprimé dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig à partir de 16,5 jpc (Jefferson et al., 2000, van Pelt et al., 1999, Saunders et al., 1998).

Chez l'Homme, les travaux concernant l'expression des ER (α et β) dans le testicule ont porté majoritairement sur le deuxième trimestre de gestation. Ils ont mis en évidence deux variants de ER β (ER β 1 et ER β 2) (Saunders et al., 2002, Brandenberger et al., 1997). Les ARNm de ces deux variant sont exprimés dans les cellules de Sertoli, les cellules germinales

et certaines cellules interstitielles (Gaskell et al., 2003, Takeyama et al., 2001, Brandenberger et al., 1997). Cependant, la protéine ER β 1 est détectée surtout dans les cellules de Sertoli et interstitielles et la protéine ER β 2 dans les cellules germinales (Gaskell et al., 2003). En ce qui concerne ER α les études sont contradictoires, certains auteurs ne retrouvant ni son messenger ni sa protéine dans le testicule fœtal humain (Gaskell et al., 2003, Takeyama et al., 2001) alors que d'autres détectent le messenger ou la protéine (Pelletier and El-Alfy, 2000, Brandenberger et al., 1997).

Avec la faible affinité du BPA pour ces récepteurs, les effets observés à faible dose sont difficilement attribuables à l'activation de ces voies de signalisation. Par ailleurs, plusieurs études montrent des courbes doses réponses non monotones (Vandenberg et al., 2012, Bouskine et al., 2009, Jenkins et al., 2011), ceci impliquant des effets différents selon le récepteur activé par le BPA, via des voies de signalisation différentes. Hormis les récepteurs « classiques » des œstrogènes, d'autres récepteurs ont la capacité de lier le BPA.

III.E.2. Récepteur membranaire GPR30

GPR30 appartient à la famille des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G. Il possède une forte affinité pour les œstrogènes et son activation induit des réponses cellulaires rapides non-génomiques (Prossnitz and Barton, 2011).

Le BPA a été décrit comme pouvant se lier au récepteur GPR30 (Thomas and Dong, 2006). La principale étude démontrant des effets du BPA via ce récepteur indique que dans une lignée cellulaire de séminome germinale, la lignée JKT-1, une augmentation de la prolifération des cellules est observée après un traitement au BPA à très faible dose (10^{-12} M) (Bouskine et al., 2009). Cet effet disparaît lorsque les cellules sont traitées au BPA en présence d'un inhibiteur de GPR30. Par ailleurs, cette étude montre également une disparition de l'effet prolifératif à forte dose, décrivant ainsi une courbe non-monotone des effets du BPA. Utilisé en temps que témoin positif, l'œstradiol inhibe la prolifération de la lignée JKT-1.

Le rôle de GPR30 dans la prolifération induite par le BPA a été confirmé dans d'autres types cellulaires comme les cellules de cancer du sein (Pupo et al., 2012).

III.E.3. Estrogen Related Receptor Gamma

ERR γ (Estrogen-related receptor gamma, NR3B3) fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, dont l'activité est comparable à celle des facteurs de transcription dépendant d'un ligand (Gibson and Saunders, 2012). Cependant, ERR γ ne possède pas de ligand physiologique connu. Des études cristallographiques semblent indiquer qu'il est capable de s'activer de façon constitutive. Le BPA possède une forte affinité pour ce récepteur et il est capable de maintenir son activité constitutive (Takayanagi et al., 2006,

Okada et al., 2008). D'autres composés synthétiques comme le DES ou le 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) sont décrits comme ligands d'ERR γ (Tremblay et al., 2001, Coward et al., 2001).

Dans un modèle *in vitro*, des effets du BPA via ERR γ ont été démontrés dans la lignée de cellules du trophoblaste JEG-3. Les auteurs décrivent des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques qui disparaissent en présence de siRNA dirigés contre ERR γ (Morice et al., 2011).

Une étude sur les niveaux d'expression des ARNm d'ERR γ dans l'organisme révèle que l'isoforme 1 du récepteur est prépondérante et fortement exprimée dans le placenta humain (Takeda et al., 2009). Ces résultats soulèvent l'hypothèse d'une accumulation de BPA au niveau placentaire.

III.E.4. Récepteur des androgènes, Aryl hydrocarbon receptor

L'une des hypothèses permettant d'expliquer les effets contradictoires retrouvés dans les différentes études expérimentales et les courbes dose-réponse non monotones est la liaison du BPA à d'autres types de récepteurs, avec une action parfois antagoniste.

Plusieurs études ont par exemple démontré la capacité du BPA à se lier au récepteur des androgènes (Lee et al., 2003, Li et al., 2010a, Xu et al., 2005). Il possède une action antagoniste sur ce récepteur, ce qui peut expliquer une partie des effets anti-androgéniques provoqués par le BPA (Paris et al., 2002).

Un autre type de récepteur a été étudié, le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon receptor). La liaison directe du BPA à ce récepteur n'est pas démontrée, mais certaines études indiquent que son niveau d'expression est modifié par des traitements au BPA (Kruger et al., 2008, Nishizawa et al., 2005).

Avec le bisphénol A, d'autres types de plastifiants sont considérés comme perturbateurs endocriniens et soulèvent des inquiétudes pour la santé publique. Parmi eux, les phtalates, également présents dans de nombreux produits de consommation courante font l'objet de nombreuses études.

IV. Phtalates

IV.A. Généralités

Les phtalates sont utilisés depuis les années 1920 en tant que plastifiants. Leur production explose à partir de 1931, où ils entrent dans la composition des PVC afin de leur conférer une certaine flexibilité (plastiques souples ou semi-rigides). Produits de la réaction de di-estérification de l'acide phtalique $C_6H_4(COOH)_2$, ils sont composés d'un noyau benzénique et de 2 groupements carboxylates de tailles variables.

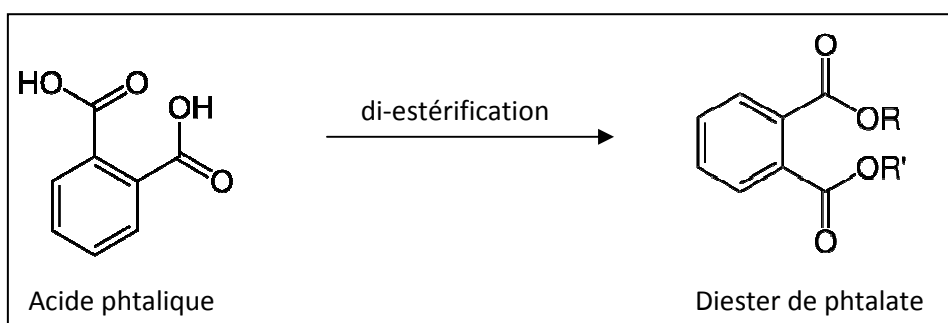


Figure 17 : Formation de phtalate par di-estérification de l'acide phtalique

Les di-esters phtaliques sont formés par l'ajout de radicaux carboxylates au niveau des fonctions alcool de l'acide phtalique.

Les phtalates sont utilisés dans de nombreux produits en PVC et également dans certains emballages plastiques, contenants alimentaires, adhésifs et colles, peintures industrielles, encres d'imprimantes, insecticides, détergents, certains produits cosmétiques, médicaments (en tant qu'excipients) et jouets d'enfants. Certains appareillages médicaux comme les poches de transfusion sanguine contiennent également des doses élevées de phtalates (Hauser et al., 2004, Heudorf et al., 2007, Koo and Lee, 2004).

A l'instar du BPA, les phtalates sont considérés comme des perturbateurs endocriniens, capables d'interférer dans la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison aux récepteurs et les voies de signalisation des hormones naturelles qui régulent les processus de développement et le maintien de l'homéostasie dans l'organisme. La principale source de contamination par les phtalates est l'ingestion. Les phtalates sont liés de façon non covalente, et peuvent donc diffuser librement depuis les contenants alimentaires. Cette diffusion peut avoir lieu pendant les périodes de conditionnement et surtout lors du chauffage des emballages alimentaires (Heudorf et al., 2007, Page and Lacroix, 1995, Petersen and Breindahl, 2000). Les contaminations par inhalation et par voie dermique sont également des

sources importantes étant donné la présence de phtalate dans les cosmétiques (Fig. 18). Des particules de phtalates sont également retrouvées dans l'air et dans les poussières domestiques (Bornehag et al., 2005, Clausen et al., 2004, Fromme et al., 2004).

Le DEHP (di(2-ethylhexyl) phtalate) est le phtalate le plus répandu. On le retrouve principalement dans les contenants et films alimentaires, les parfums, les peintures ou le matériel médical.

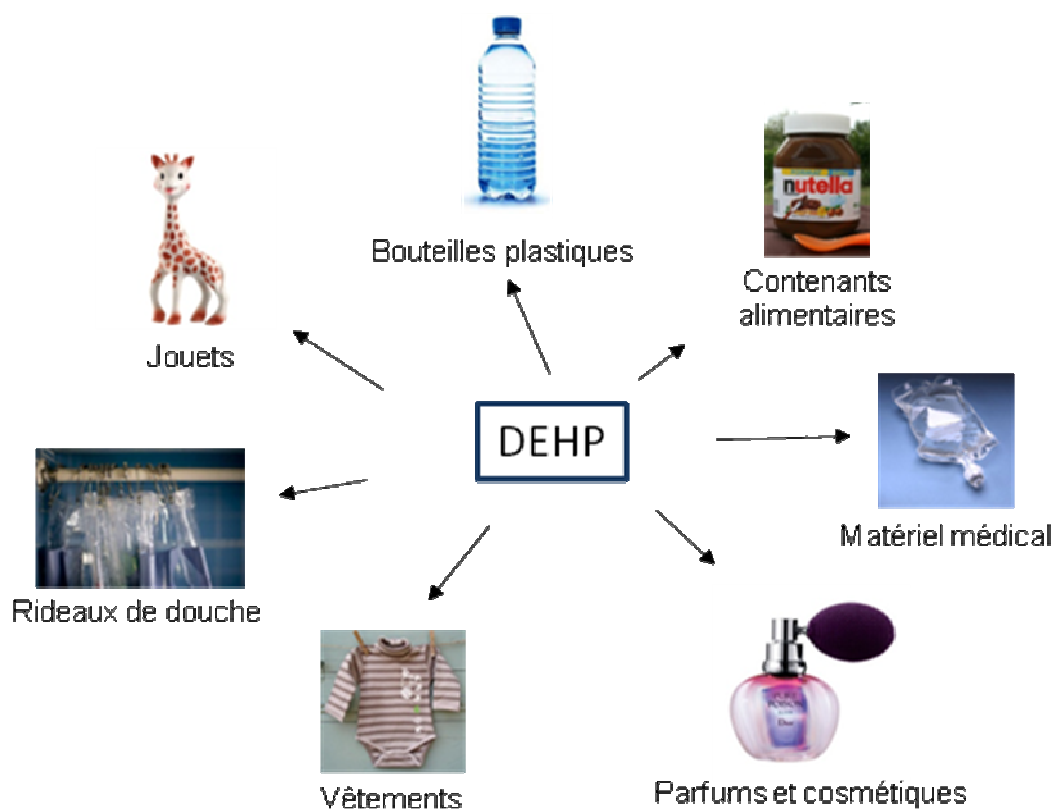


Figure 18 : Potentielles sources d'exposition au DEHP

Le DEHP est le phtalate le plus produit au monde, présent dans plusieurs types de produits de consommation courante

La législation en Europe et en France interdit la fabrication et l'importation d'articles de puériculture dont la composition en phtalate est supérieure à 0,1% de la masse plastique totale. Les phtalates restent autorisés dans la plupart des autres produits de consommation quotidienne car d'après les autorités responsables, les concentrations retrouvées dans l'organisme ne sont pas toxiques. Au Canada, la législation impose néanmoins d'indiquer aux consommateurs la présence de phtalate dans les produits.

IV.B. Métabolisme et toxicocinétique

Dans l'organisme, les phtalates, ingérés sous forme de di-esters phtaliques, sont rapidement métabolisés. Cette métabolisation peut s'effectuer en plusieurs étapes. La première réaction enzymatique est l'hydrolyse du diester de phtalate en mono-ester, au niveau des chaînes carbonées. Le métabolite primaire ainsi créé est considéré comme le composé biologiquement actif (Heindel and Powell, 1992). Cette réaction a principalement lieu au niveau de l'intestin et de différents organes parenchymateux. Les phtalates à chaînes carbonées courtes comme le DEP (diéthyl phtalate) ou le DMP (diméthyl phtalate) ne subissent que cette étape, les phtalates à chaînes carbonées longues comme le DiBP (diisobutyl phtalate), DnBP (di-N-butyl phtalate) ou le DEHP peuvent subir des modifications secondaires d'hydroxylation, oxydation et/ou conjugaison, permettant ainsi la formation de plusieurs métabolites différents (Frederiksen et al., 2007).

La conjugaison des mono-esters de phtalates s'effectue grâce à l'uridine 5'-diphosphoglucoronyle transférase qui ajoute un groupement glucuronide au niveau du groupement alcool du mono-ester. Cette réaction augmente la solubilité du phtalate dans l'eau et lui permet d'être plus facilement éliminé dans les urines (Koch et al., 2005b, Silva et al., 2003).

L'hydrolyse du DEHP est réalisée par des lipases non spécifiques (monooxygénases mixtes cytochrome p450 dépendantes) situées au niveau intestinal ou pancréatique (Albro et al., 1982). Cette réaction a pour produit le MEHP (mono(2-ethyl hexyl) phtalate), métabolite actif du DEHP, et le 2-ethylhexanol (Barber et al., 1994, Gray and Beamand, 1984). Le MEHP peut ensuite subir une série de transformations secondaires de sa deuxième chaîne aliphatique carbonée, conduisant à la synthèse de différents métabolites secondaires (Koch et al., 2006, Koch et al., 2003, Silva et al., 2003). Il existe environ une quinzaine de métabolites secondaires du DEHP dont les principaux sont le Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phtalate (5OH MEHP), le Mono (2-ethyl-5-oxo-hexyl) phtalate (5oxo MEHP), le Mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phtalate (5cx MEPP) et le Mono (2-(carboxymethyl) hexyl) phtalate (2cs MMHP).

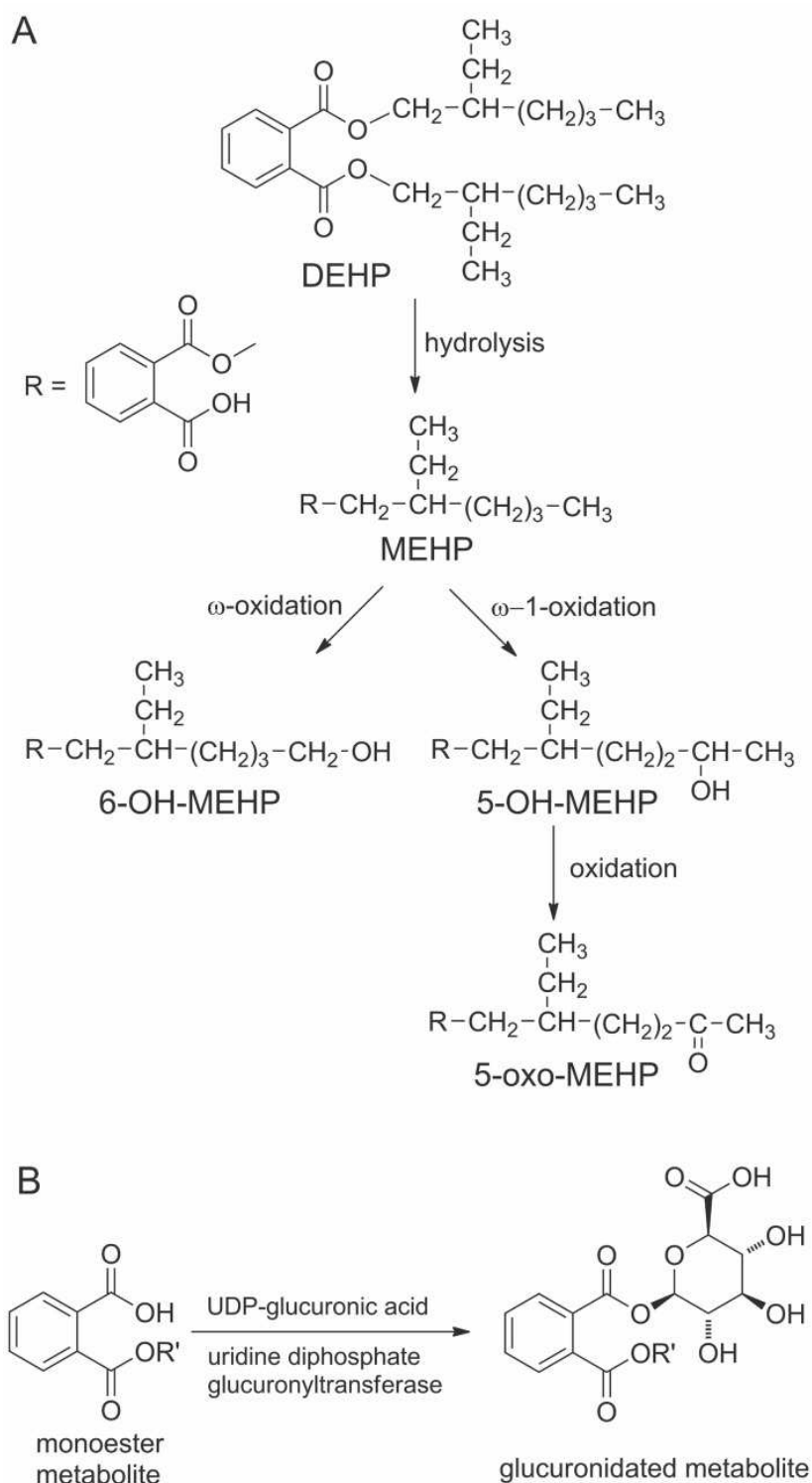


Figure 19 : Métabolisation du DEHP et glucuronidation (d'après Testa et al., 2012)

A : Le DEHP peut subir une première réaction d'hydrolyse ayant pour produit le MEHP. Des réactions secondaires peuvent aboutir à la métabolisation d'autres phthalates mono-esteriques comme le 6-OH-MEHP, 5-OH-MEHP ou le 5-oxo-MEHP. B : Ces métabolites peuvent à leur tour subir une réaction de glucuronidation par les glucuronyltransférases.

Le haut niveau de métabolisation des phtalates et la quantité de métabolites différents rend particulièrement difficile leur dosage dans les fluides biologiques. En 2004 et en 2005, Koch et al. ont réalisé une étude expérimentale afin d'évaluer les taux d'élimination de phtalates. A l'aide de DEHP marqué au deutérium, les auteurs constatent que 65 à 70% de la quantité de DEHP ingérée par voie orale par un volontaire, est éliminée en 24h (Koch et al., 2004, Koch et al., 2005a). Uniquement 7,3% de la dose administrée est excrétée sous forme de MEHP, la majorité étant excrétée sous forme de métabolites secondaires. Ceci s'explique par le fait que les métabolites secondaires sont plus facilement conjugués et donc plus facilement éliminés. Par conséquent, si le MEHP est retrouvé en faible quantité dans les urines, c'est en revanche le métabolite le plus présent dans le plasma sanguin (Wittassek et al., 2007).

Un nombre conséquent d'études ont été effectuées afin de mesurer les taux des différents phtalates et de leurs métabolites dans le but d'évaluer la toxicité de ces composés.

IV.C. Taux d'exposition de la population

Bien que les phtalates ne s'accumulent pas dans l'organisme comme d'autres composés chimiques, leur présence ubiquitaire dans l'environnement entraîne une exposition chronique. Les phtalates possèdent des effets propres selon leur degré de métabolisation, il est donc important de relever séparément les concentrations des différents composés dans l'organisme, qu'ils soient présents sous forme de diesters (DEHP, DBP (dibutyl phtalate), DiNP (di-isononyl phtalate) etc...) ou de mono-esters (MEHP, MBP (monobutyl phtalate), MiNP (mono-isononyl phtalate) etc...). Ils ont été détectés dans de nombreux tissus et fluides biologiques tels que l'urine, le sang, le sperme, le liquide amniotique ou le lait maternel.

Nous avons focalisé notre attention sur le MEHP, métabolite du DEHP, le phtalate le plus utilisé avec une production mondiale de plus de 4 millions de tonnes par an.

Les concentrations relevées dans le sang peuvent être extrêmement variables d'un individu à l'autre. On retrouve par exemple dans une étude effectuée en Suède chez 1 000 individus, des concentrations sériques de MEHP variant de 0,47 ng/mL ($1,7 \cdot 10^{-9}$ M) à 415 ng/mL ($1,5 \cdot 10^{-6}$ M), avec une moyenne de 3,76 ng/mL ($1,3 \cdot 10^{-8}$ M) (Olsen et al., 2012).

La même moyenne de 3,7 ng/mL ($1,3 \cdot 10^{-8}$ M) est retrouvée dans le sang d'une population d'hommes américains sains, partenaires de femmes enceintes, dans l'étude « Study for Future Families » (Mendiola et al., 2012).

Récemment, dans une cohorte de 881 hommes danois sains, des résidus de phtalates ont été retrouvés dans 94 % des individus. La concentration moyenne de MEHP relevée dans leur urine est de $2,4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (max. $6,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) (Joensen et al., 2012).

Une autre étude a été réalisée dans un groupe de femmes enceintes, entre 25 et 35 ans, et leurs enfants à 2 ans et à 5 ans. Les concentrations de MEHP relevées dans l'urine sont de $3,8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (max. $5,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) chez les femmes, $2,8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (max. $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) à 2 ans et $3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (max. $3,4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) à 5 ans (Lin et al., 2011b).

Cette étude rapporte également des données importantes concernant l'exposition en période foétale et néonatale : dans le lait maternel, la concentration moyenne est de $1,3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, et dans le sang de cordon ombilical, la concentration moyenne est de $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (Lin et al., 2011a).

	Masse volumique de MEHP (ng/mL)	Concentration molaire de MEHP (M) (valeur moyenne)	Références
Sang	0,47 à 415 3,7	$1,7 \cdot 10^{-9}$ à $1,5 \cdot 10^{-6}$ $1,3 \cdot 10^{-8}$	Olsén et al., 2011 Mendiola et al., 2012
Urine	6,7	$2,4 \cdot 10^{-8}$	Joensen et al., 2012
Lait Maternel	3,7 8,3	$1,3 \cdot 10^{-8}$ $3 \cdot 10^{-8}$	Lin et al., 2011 Latini et al., 2009
Sang de cordon ombilical	3,1	$1,1 \cdot 10^{-8}$	Lin et al., 2011

Tableau 6 : Taux moyens de MEHP mesurés dans les différents fluides biologiques d'adultes sains

Dans différents fluides biologiques, les taux de BPA ont été mesurés par spectrométrie HPLC ou par dosage ELISA.

Aussi bien à l'âge adulte qu'au cours de la vie foétale, la concentration moyenne d'exposition des populations reste autour de 10^{-8} M . Cependant, l'omniprésence des phtalates dans notre environnement induit des taux extrêmement variables et certains individus peuvent présenter des taux de phtalates 100 fois supérieurs à la moyenne. Ainsi, dans le sang de cordon ombilical, les valeurs maximales mesurées peuvent atteindre 10^{-5} M (Latini et al., 2003) et dans le lait maternel, jusqu'à $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Main et al., 2006). De plus, nous ne nous sommes intéressés ici qu'à un métabolite du DEHP. Bien qu'il soit majoritaire, il faut garder à l'esprit que nous sommes également exposés à d'autres phtalates diésteriques et à d'autres

métabolites, ayant potentiellement des effets synergiques ou cumulatifs avec le MEHP. De plus en plus d'études toxicologiques sur l'effet des polluants environnementaux et plus particulièrement des phtalates se sont penchées sur la question d'un effet cumulatif de l'exposition à plusieurs phtalates présentant un même mécanisme de perturbation du développement (Rider et al., 2010). Au niveau européen, l'EFSA (European Food Safety Agency) a défini la DJA (dose journalière admissible) qui correspond à la dose journalière maximum qu'un individu peut ingérer sans risque (Wittassek et al., 2007). Toutefois, cette notion de DJA est établie pour chaque phtalate (DEHP : 50µg/kg/jour, DiBP, DnBP : 10µg/kg/jour) et se base sur les données toxicologiques relatives à l'exposition exclusive à ce composé, alors que toutes les études rapportant les mesures de taux de phtalates dans différents fluides biologiques mettent bien en évidence une exposition simultanée à plusieurs phtalates (DBP, DEHP, etc) (Hogberg et al., 2008, Main et al., 2006, Swan et al., 2005). Dans le cadre de l'évaluation des risques encourus par les populations humaines, ces données obligent à reconsidérer la notion de DJA afin de l'assimiler à la potentialité d'une exposition à de multiples molécules dont la dose cumulée dépasse très certainement la DJA fixée pour une molécule seule (Wittassek and Angerer, 2008).

IV.D. Toxicité du DEHP et du MEHP sur l'organisme

Des études cherchant à déterminer le degré de toxicité des phtalates, et en particulier du MEHP, sont menées depuis plus de 30 ans (Thomas and Northup, 1982).

Aujourd'hui, de nombreuses données ont été répertoriées et la toxicité du MEHP est avérée dans plusieurs organes.

Les premières études mettant en évidence un effet délétère des phtalates ont été réalisées sur des rats adultes après contamination chronique au DEHP. Les rats sont alors atteints d'hépatomégalie, due à une hyperplasie et à une hypertrophie des hépatocytes (Lake et al., 1975, Reddy et al., 1976). Ainsi le foie est le premier organe cible bien identifié de l'effet délétère des phtalates. Ces perturbateurs endocriniens sont reconnus comme ayant la capacité de modifier la régulation des voies métaboliques. Des corrélations entre les taux de phtalates dans l'organisme et les risques de diabète ont été établies dans plusieurs études, notamment chez les femmes (James-Todd et al., 2012) ou chez les personnes âgées (Lind et al., 2012).

A un autre niveau, des effets neurotoxiques des phtalates sont suspectés. Des études comportementales font le lien entre l'exposition prénatale aux phtalates et le développement de l'enfant (Yolton et al., 2011). En 2012, une étude française a établi une relation

significative entre les concentrations de certains métabolites des phtalates et l'apparition de troubles du spectre autistique (Testa et al., 2012). Les phtalates exercent également un effet délétère sur la thyroïde. L'exposition de rats adultes au DBP ou au DEHP induit une diminution de la production d'hormones thyroïdes (T3 et T4) (Hinton et al., 1986, O'Connor et al., 2002). De plus, chez l'Homme, des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre les taux de phtalates élevés et un dysfonctionnement thyroïdien (Huang et al., 2007, Meeker et al., 2007). Des effets négatifs ont également été décrits au niveau du système immunitaire (Koike et al., 2009, Larsen and Nielsen, 2008).

Avec les voies du métabolisme hépatique et les fonctions neurologiques, la fonction de reproduction est l'une des cibles majeures de la toxicité des phtalates.

Aussi bien chez le mâle que chez la femelle, des études expérimentales réalisées chez l'animal démontrent que les phtalates entraînent des dysfonctionnements de la fonction de reproduction. De plus, plusieurs études épidémiologiques associant les taux d'exposition aux phtalates et l'apparition de certaines pathologies, viennent appuyer ces résultats expérimentaux.

IV.D.1. Effets du DEHP et du MEHP sur la fonction de reproduction mâle

Le DEHP et ses métabolites peuvent induire des dysfonctionnements de la fonction de reproduction chez l'individu adulte, mais il semblerait que ces composés exercent majoritairement leurs effets en altérant le développement de cette fonction en période fœtale et périnatale. Nous avons ainsi choisi de focaliser notre revue bibliographique sur les effets des phtalates durant cette période. Les phtalates sont capables d'affecter les 2 fonctions principales du testicule fœtal, à savoir la stéroïdogénèse et la gamétogénèse.

a. Etudes expérimentales in vivo

Afin d'étudier les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement fœtal, la plupart des expérimentations chez les rongeurs ont été réalisées par gavage de mères gestantes en période de gestation et de lactation.

Les premières études réalisées chez le rat ont montré d'importants effets anti-androgéniques en réponse à différents phtalates (DBP, BBP (benzylbutyl phtalate), DEHP) pour des doses allant de 100 à 1 000 mg/kg/jour. Des pathologies liées à la masculinisation, symptômes du TDS apparaissent en premier lieu. Des cas d'hypospadias sont observés (Foster et al., 2001, Saillenfait et al., 2009), ainsi que des cas de cryptorchidie ou d'anomalies de descente testiculaire (Ema and Miyawaki, 2001, Saillenfait et al., 2011b, Shono et al., 2005). Dans le

même sens, une réduction de la distance ano-génitale de la progéniture mâle (Borch et al., 2005, Borch et al., 2004, Christiansen et al., 2010, Saillenfait et al., 2011b, Tyl et al., 2004) est également observée. Ces paramètres sont considérés comme des critères solides de la masculinisation de l'individu car leur développement est fortement sous contrôle de la testostérone (Scott et al., 2009).

De même, toujours chez le rat, au niveau de la gonade, le DBP (500 mg/kg/jour) ou le DEHP (750 mg/kg/jour) administrés au cours de la vie fœtale entraînent une diminution du poids des testicules et une baisse de la qualité spermatique, ainsi qu'une baisse de fertilité (Alam et al., 2010, Fisher et al., 2003, Foster, 2006, Mahood et al., 2005, Mylchreest et al., 2000, Wilson et al., 2007).

Ces effets sont potentiellement corrélés aux modifications hormonales engendrées par les phtalates. En effet chez le rat, les phtalates affectent la synthèse de stéroïdes. L'exposition à des doses de 100 à 1 250 mg/kg/jour de DEHP, en période de gestation, de 12 à 21 jpc, entraîne une diminution de la production de testostérone (Akingbemi et al., 2001, Culty et al., 2008). Il est intéressant de noter que cet effet est observable à 21 et à 35 jpp, et non à 90 jpp. L'atteinte des cellules de Leydig peut aussi se manifester par une diminution de leur nombre (Lin et al., 2008a), une hyperplasie (Borch et al., 2006b, Culty, 2009, Fisher et al., 2003) ou encore par la formation de clusters de cellules, phénomène retrouvé dans plusieurs études après traitement par différents types de phtalates (Mahood et al., 2005, Parks et al., 2000, Scarano et al., 2010). Bien que le DBP et le DEHP soient les phtalates les plus étudiés et les plus répandus, d'autres phtalates connus exercent également des effets délétères chez le rat. Le traitement de rats *in utero* au DnHP (di-n-hexyl phthalate) ou au DiBP induit une diminution de leur AGD, ainsi que des malformations génitales de type hypospadias ou défaut de descente testiculaire (Saillenfait et al., 2009, Saillenfait et al., 2008). De même, le di-n-heptyl phthalate (DHPP) induit une diminution de l'AGD, sans malformation génitale (Saillenfait et al., 2011a).

De façon surprenante, chez la souris, des effets opposés, pro-androgéniques, ont été observés. Après administration de DEHP entre 0,5 et 50 000 µg/kg/jour à des mères gestantes de 9 à 18 jpc, les taux de testostérone de la mère et du fœtus sont augmentés. Il a également été observé une augmentation de l'AGD dans la descendance. Dans cette étude, l'effet du DEHP suit une courbe dose-réponse non-monotone, puisqu'à la très forte dose de 500 000 µg/kg/jour, ces effets ne sont pas observés (Do et al., 2012). De même, le traitement *in utero* de marmouset (*Callithrix jacchus*) au DBP pendant la vie fœtale (500 mg/kg/jour de la 7^{ème} à la 15^{ème} semaine de gestation) ne modifie pas la synthèse de testostérone (McKinnell et al., 2009).

Ainsi les effets négatifs sur la stéroïdogénèse semblent spécifiques du modèle rat. En ce qui concerne la gamétogenèse, les effets sur les cellules germinales et sur la taille des cordons séminifères sont retrouvés aussi bien chez la souris (Gaido et al., 2007) que chez le rat (Ferrara et al., 2006) où une diminution du nombre de cellules germinales a été observée après exposition *in utero*. Dans cette même étude chez le rat, les auteurs indiquent que le DBP entraînerait un retard de différenciation des cellules germinales, marqué par un retard d'entrée en quiescence et le maintien de l'expression du marqueur de pluripotence OCT3/4 (Ferrara et al., 2006). Ces défauts de cellules germinales peuvent être dus à des dysfonctionnements de leurs cellules de soutien, les cellules de Sertoli. Différentes études ont mis en évidence des défauts de maturation des cellules de Sertoli (Borch et al., 2006a), une diminution de leur nombre (Scott et al., 2007), de leur prolifération (Auharek et al., 2010), ou une altération des protéines de jonctions cellulaires de type vimentine et cadhérines (Kleymenova et al., 2005), après traitement par des phtalates. Enfin, plusieurs études ont mis en évidence l'apparition de gonocytes plurinucléés après traitement au DiBP ou au DBP *in utero* chez le rat (Boekelheide et al., 2009, Borch et al., 2006a, Ferrara et al., 2006, Kleymenova et al., 2005). Ces derniers effets sont également observés dans certaines études *in vitro*.

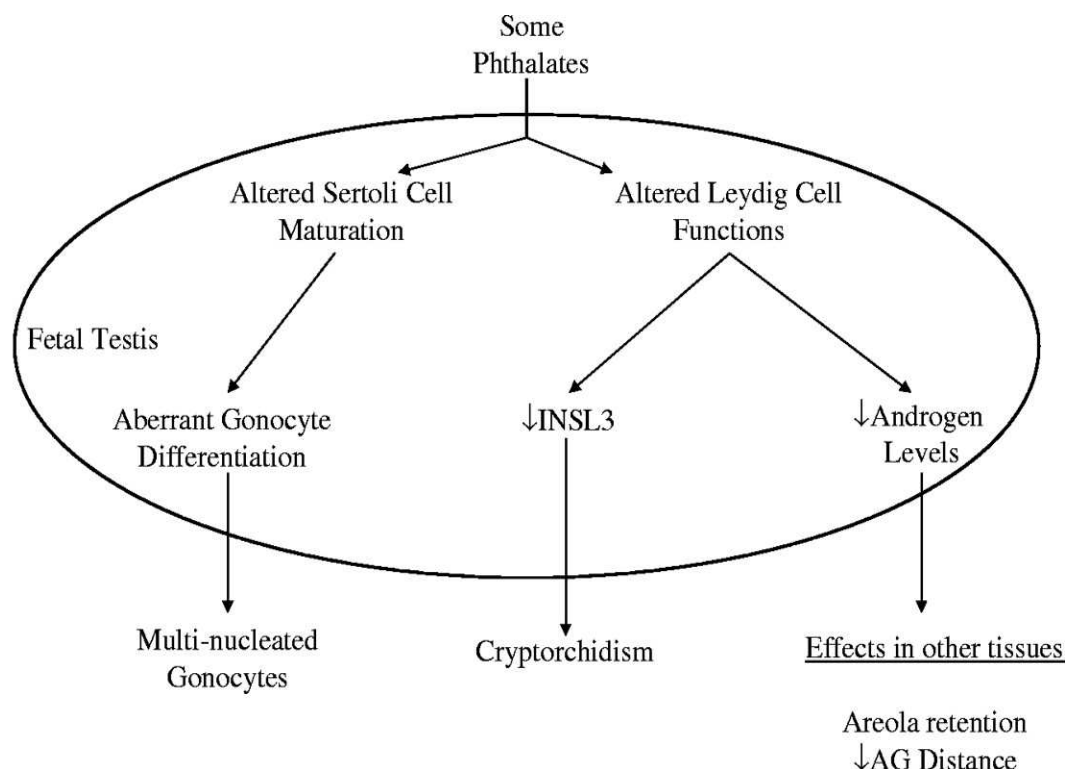


Figure 20 : Effets des phtalates sur le développement du testicule de rat (D'après Corton et al., 2005)

b. Etudes expérimentales in vitro

Le modèle de culture organotypique de testicules fœtaux développé dans notre laboratoire (Lambrot et al., 2006a, Livera et al., 2006) a permis de réaliser plusieurs études concernant le développement de cet organe, à la fois chez les rongeurs et chez l'Homme.

Chez le rat, les premières études effectuées sur ce modèle ont montré que le MEHP, diminue le taux de testostérone sécrété par des testicules fœtaux prélevés à 14,5 jpc, puis mis en culture en présence de MEHP à 10^{-5} M. Il est important de noter que cet effet ne s'observe pas après un traitement au DEHP (Chauvigne et al., 2009).

Inversement, chez la souris, à un âge comparable de 13,5 jpc, conformément aux résultats observés *in vivo*, le MEHP augmente la production fœtale de testostérone. En revanche, au niveau des cellules germinales, on observe une diminution de leur nombre, par une augmentation de leur taux d'apoptose ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules plurinucléées (Lehraiki et al., 2009).

La première étude concernant les effets du MEHP sur le testicule fœtal humain démontre qu'à la concentration de 10^{-5} M, le MEHP ne modifie pas le taux de sécrétion de testostérone, contrairement à ce que l'on observe chez les rongeurs. En revanche, le MEHP diminue le nombre de cellules germinales en augmentant leur taux d'apoptose, après 72h de culture (Muczynski et al., 2012a, Lambrot et al., 2009).

Ces études mettent en évidence les différences inter-espèces existant vis-à-vis des effets des perturbateurs endocriniens. Le modèle de culture organotypique étant un modèle d'étude d'effets directs, les différences inter-espèces peuvent être encore plus grandes *in vivo*, étant donné les différences qui peuvent exister entre les voies métaboliques des espèces étudiées.

Par conséquent, pour répondre à des problématiques de santé publique, il est important d'étudier les effets chez l'Homme de manière spécifique. Pour cela, on dispose de données épidémiologiques, et expérimentalement, le modèle de culture organotypique est bien sûr la seule méthode d'approche possible.

c. Etudes épidémiologiques

Chez l'Homme, quelques études mettent en relation les taux d'exposition aux phtalates et les dysfonctionnements d'ordre sexuel et particulièrement les troubles liés au processus de masculinisation et au TDS.

Une première étude a montré une corrélation entre les taux de métabolites des phtalates dans l'urine des femmes enceintes et l'apparition d'anomalies telles qu'une diminution de

l'AGD, facteur de masculinisation. Cependant, parmi les multiples métabolites étudiés dans ces travaux, le MEHP n'est pas corrélé de façon significative à ces dysfonctionnements (Swan et al., 2005). Cette corrélation n'a pas été retrouvée dans une autre cohorte (Huang et al., 2009). Dans une autre étude, une corrélation a été mise en évidence entre le taux de phtalates dosé dans le lait maternel et des variations des taux d'hormones sériques (Main et al., 2006).

Dans les travaux récents de Mendiola et al., le taux de phtalates urinaire a été comparé aux taux d'hormones sériques. Cette étude regroupe 2 cohortes d'individus pour lesquels des articles avaient été publiés auparavant, un groupe d'hommes fertiles (Mendiola et al., 2011) et un groupe d'hommes infertiles (Meeker et al., 2009). Dans chaque groupe, le taux de MEHP urinaire est inversement corrélé avec les taux de testostérone libre, d'œstradiol et avec l'indice d'androgène libre (FAI, *free androgen index*), qui correspond au rapport entre le taux de testostérone totale et le taux de SHBG (*sex hormon-binding globulin*) (Mendiola et al., 2012).

Enfin, ces mêmes corrélations ont été retrouvées dans l'étude de Joensen et al. réalisée sur un groupe d'hommes danois sains. Le taux de MEHP urinaire est inversement corrélé aux concentrations de testostérone (totale et libre) ainsi qu'au FAI (Joensen et al., 2012).

Ainsi, bien que quelques études incriminent spécifiquement le MEHP, dans le cadre d'une étude épidémiologique, on ne peut exclure l'hypothèse selon laquelle les effets observés peuvent être dus à différents métabolites, possédant un effet lié ou non, à celui du MEHP.

IV.E. Mécanisme d'action

Les effets des phtalates dans plusieurs organes sont connus, mais leur mode d'action au sein des cellules cibles l'est beaucoup moins. Une hypothèse est particulièrement mise en avant, celle de l'activation par les phtalates des récepteurs nucléaires PPARs (peroxisome-proliferating activated receptor).

IV.E.1. Voie des récepteurs PPARs

Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. La famille des PPARs a 3 membres, PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) et PPAR γ (NR1C3). Physiologiquement, ils sont impliqués dans les voies de métabolisme des lipides et notamment dans la synthèse des acides gras et du cholestérol (Berger et al., 2005). Le rôle des PPARs dans la toxicité due aux phtalates a été démontré dans un premier temps dans le foie. Les phtalates induisent une augmentation de la prolifération et une inhibition de l'apoptose des

hépatocytes, induisant ainsi des cas d'hépatomégalies et d'hépatocarcinomes (Rusyn et al., 2006). Plusieurs études effectuées grâce à des plasmides contenant des gènes rapporteurs pour les différents PPARs ont permis de montrer que les phtalates ont la capacité d'activer ces récepteurs de façon directe (Lapinskas et al., 2005, Hurst and Waxman, 2003).

Physiologiquement, PPAR γ est activé par la liaison de ligands naturels tels que les acides gras polyinsaturés et les métabolites des prostaglandines, comme la 15-deoxy δ 12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2). Il peut aussi être activé par des ligands synthétiques comme les thiazolidinediones (TZD) ou aussi nommés glitazones (Lehmann et al., 1995). Ces ligands sont souvent administrés à des patients insulino-résistants atteints de diabète de type II (Staels and Fruchart, 2005, Gurnell et al., 2003, Houseknecht et al., 2002) afin d'augmenter leur sensibilité à l'insuline. L'activation de la voie des PPARs s'effectue par hétéro-dimérisation avec les récepteurs RXRs (retinoid x receptor).

Chez l'adulte, PPAR α et PPAR β/δ sont exprimés dans les trois principaux types cellulaires du testicule (Sertoli, Leydig et cellules germinales). L'expression de PPAR γ est majoritaire au niveau des cellules de Sertoli (Corton and Lapinskas, 2005), mais on détecte également de l'ARNm PPAR γ dans les spermatocytes (Thomas et al., 2005). Plus récemment, en période foétale, entre 7 et 12 semaines de gestation, la présence d'ARNm de PPAR γ a été détecté spécifiquement dans les cellules germinales et non dans les cellules somatiques (Muczynski et al., 2012b).

Ces récepteurs ne semblent pas avoir de rôle prépondérant sur la fertilité, les souris invalidées pour PPAR α et PPAR β/δ étant fertiles (Peters et al., 2000, Lee et al., 1995). En revanche, l'invalidation de PPAR γ est létale à 10 jpc (Barak et al., 1999).

Concernant l'activation des PPARs par les phtalates, dans le testicule, elle a été décrite *in vitro*. Dans des cultures primaires de cellules de Sertoli. Les récepteurs subissent une translocation vers le noyau après une incubation en présence de DEHP (Dufour et al., 2003, Bhattacharya et al., 2005).

Par ailleurs, il a été démontré que PPAR γ est davantage exprimé dans les cellules de cancer testiculaire par rapport aux tissus testiculaires normaux. De plus, les agonistes naturels (15d-PGJ2) ou synthétiques (TZDs) ont un effet antiprolifératif sur les cellules testiculaires cancéreuses (Hase et al., 2002). Les 3 PPARs sont exprimés dans le testicule foetal, et leur activation par les phtalates est démontrée.

Dans le testicule foetal de rat, après traitement au DEHP ou au DiBP de 7 à 21jpc, l'expression de l'ARNm de PPAR α est diminuée, ainsi que l'expression de la protéine PPAR γ (Boberg et al., 2008, Borch et al., 2006b). Dans une autre étude, Ryu et al. démontrent que le DEHP induit l'apoptose dans le testicule de rat, via PPAR γ (Ryu et al., 2007).

Chez l'Homme, des traitements cliniques à base d'agoniste des PPARs, de type troglitazone ou rosiglitazone, induisent une diminution du taux de testostérone chez l'adulte (Vierhapper et al., 2003, Bloomgarden et al., 2001). L'implication des récepteurs PPARs dans la régulation du métabolisme et dans le transport du cholestérol (Xie et al., 2002), précurseur de la chaîne de synthèse des stéroïdes permet d'émettre une hypothèse quant au mécanisme d'action des phtalates sur la diminution du taux de testostérone foétale observée après traitement *in utero*.

L'ensemble de ces données expérimentales font des PPARs les plus probables médiateurs des effets des phtalates sur la fonction de reproduction.

IV.E.2. Autres types de récepteurs

a. Récepteurs aux hormones stéroïdes

D'autres types de récepteurs nucléaires sont des cibles potentielles des phtalates. Parmi eux, les récepteurs aux hormones stéroïdes ER α (NR3A1), ER β (NR3A2), AR (NR3C4), NR3C1 (récepteurs aux glucocorticoïdes) et NR3C2 (récepteurs aux minéralocorticoïdes) ont la capacité de lier les phtalates ou sont impliqués dans leurs mécanismes d'action.

D'après une analyse globale de la capacité de liaison de plusieurs phtalates, une majorité d'entre eux auraient un effet agoniste sur ER α et un effet antagoniste sur ER β (Takeuchi et al., 2005). Plusieurs études réalisées sur la lignée de cancer du sein œstrogène-dépendant MCF-7, exprimant fortement ER α ont démontré que le DBP et le BBP étaient capables d'induire la prolifération des cellules (Andersen et al., 1991, Harris et al., 1997, Jobling et al., 1995).

Concernant le testicule foetal de souris, les résultats obtenus dans notre laboratoire montrent que les effets du MEHP sur la diminution du nombre de cellules germinales et sur la production de testostérone sont retrouvés dans les souris invalidées pour ER α , ER β et AR. Ceci suggère que ces effets sur le testicule pendant la vie foétale sont indépendants de ces récepteurs (Lehraiki et al., 2009).

Sans démonstration concrète de la liaison des phtalates à ces récepteurs, quelques études évoquent également l'implication des récepteurs aux glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes dans les mécanismes d'action des phtalates. En effet, l'administration de DBP à des rats prépubères entraîne, en parallèle de la diminution de testostérone, une augmentation dose dépendante à la fois du niveau des glucocorticoïdes et du niveau d'expression du récepteur aux glucocorticoïdes dans le testicule (Xiao-feng et al., 2009). De même, une étude a montré

que le traitement de rats *in utero* au DEHP entre 14 et 19 jpc, entraîne dans le testicule adulte une réduction de l'expression du récepteur aux minéralocorticoïdes dans les cellules de Leydig au niveau transcriptionnel et protéique. Ces résultats sont corroborés par la diminution de l'expression de différents gènes cibles des minéralocorticoïdes (Martinez-Arguelles et al., 2009).

b. Autres récepteurs

D'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires sont susceptibles d'être impliqués dans les effets des phtalates.

CAR (Constitutive Androstane Receptor ou NR1I3) est un récepteur nucléaire qui fonctionne en hétérodimère avec RXR, comme les récepteurs PPARs. Ce récepteur nucléaire a la particularité d'être constitutivement actif. En revanche, la présence de son ligand (l'androstanoïde ou l'androsténoïde) induit le relargage de coactivateurs et la répression transcriptionnelle des gènes cibles (Forman et al., 1998). Plusieurs études ont montré que le DEHP pouvait activer CAR dans des hépatocytes murins. En effet, le traitement de ces cellules au DEHP induit l'expression de *Cyp2b10*, un gène cible de CAR (DeKeyser et al., 2011, Eveillard et al., 2009). L'inactivation de CAR par shRNA supprime totalement l'expression de *Cyp2b10* induite par le DEHP montrant ainsi la nécessité du récepteur CAR dans ce mécanisme (Eveillard et al., 2009). Dans le foie des souris invalidées pour PPAR α , l'augmentation de l'expression de *Cyp2b10* après traitement au DEHP montre que la voie CAR est activée (Ren et al., 2010). Ceci démontre que les phtalates possèdent des cibles moléculaires multiples dans l'organisme. De plus, dans une étude comparative entre des souris sauvages et des souris possédant le gène PPAR α humanisé, il est démontré que le DEHP active CAR dans le foie, et de façon plus importante chez la souris « humanisé », suggérant ainsi une interaction entre la voie des PPARs et la voie du récepteur CAR (Ito et al., 2012).

PXR (Pregnane X Receptor ou NR1I2) appartient au même groupe que CAR et fonctionne lui aussi en dimère avec RXR. PXR intervient dans l'activation d'enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes ainsi que dans la détoxification des xénobiotiques et de l'acide biliaire (Goodwin et al., 2003, Xie et al., 2001, Waxman, 1999). Les métabolites MEHP et MBzP (Mono Benzyl Phtalate) auraient un effet agoniste sur PXR, d'après une étude réalisée sur des cellules HepG2 (lignée humaine d'hépatocarcinome) après transfection d'un plasmide contenant le PXR humain (Hurst and Waxman, 2004). Une autre étude réalisée sur des hépatocytes de souris démontre également des modifications du niveau d'expression de gènes cibles de PXR après traitement au DEHP ou DiNP (DeKeyser et al., 2011).

V. Objectifs

Les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et leurs conséquences sur les fonctions de reproduction humaine et animale sont croissantes. De nombreuses études suggèrent que l'apparition des anomalies de la fonction de reproduction masculine est due à l'effet des perturbateurs endocriniens, capables même à faible concentration, de modifier l'équilibre hormonal et ainsi de perturber le fonctionnement de l'organisme. Parmi ces perturbateurs endocriniens, de nombreux produits chimiques et notamment les plastifiants, de plus en plus présents dans notre environnement, ont été incriminés. Les phtalates et le BPA comptent parmi les plastifiants les plus produits et sont donc retrouvés dans les fluides biologiques d'une grande majorité de la population.

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées dans des modèles animaux afin de déterminer le niveau de toxicité du BPA. Les effets chez le rat et la souris, qui sont les modèles classiques d'études expérimentales dans le domaine de la toxicologie, ont été largement décrits. En revanche, les études chez l'Homme se limitent principalement à des études épidémiologiques. Grâce à une collaboration établie entre notre laboratoire et le service de gynécologie-obstétrique de l'Hôpital Antoine Bécclère, nous avons la possibilité d'effectuer nos études sur les gonades de fœtus issus d'IVG réalisées au premier trimestre de gestation. Ainsi, grâce à notre modèle de culture organotypique, nos expérimentations ont été réalisées dans les mêmes conditions et à la même période de développement à la fois chez l'Homme et chez les rongeurs dans le but d'effectuer une analyse rigoureuse des effets du BPA sur le testicule fœtal.

Concernant les phtalates, des études antérieures ont clairement démontré les effets délétères du MEHP sur la gamétogenèse et sur la stéroïdogénèse dans le testicule fœtal. Il est désormais important de tenter de comprendre les mécanismes par lesquels s'exercent ces effets. Nous avons focalisé notre étude sur la gamétogenèse, qui est altérée par le MEHP à la fois chez l'Homme et chez les rongeurs. Les conséquences d'une altération des cellules germinales en période fœtale peuvent être extrêmement délétères. En effet, d'une part la diminution du nombre de cellules germinale peut être la cause d'infertilité à l'âge adulte, et d'autre part, des défauts de différenciation de ces cellules peuvent entraîner l'apparition de cancer testiculaire.

Ce travail de thèse s'articule donc autour de deux objectifs :

- Identifier les effets du BPA sur le développement du testicule fœtal humain et comparer la sensibilité du modèle humain par rapport au modèle rongeur.
- Déterminer les mécanismes d'action par lesquels le MEHP affecte les cellules germinales dans le testicule fœtal de souris.

MATERIEL ET METHODES

I. Prélèvements

I.A. Prélèvement des testicules fœtaux humains

Les testicules fœtaux humains utilisés lors de cette étude proviennent du service de gynécologie obstétrique de l'hôpital Antoine Béchère dirigé par le Pr. Alexandra Benachi. Le projet a été soumis et validé par le comité local d'éthique médicale et par l'agence française de biomédecine (référence PFS12-002). Un consentement écrit de chaque patiente pour un prélèvement à but scientifique est requis pour chaque échantillon.

Les fœtus âgés de 6 à 12 semaines de gestation sont issus d'IVG (Interruption Volontaire de Grossesse) pour raison non médicale et ne présentent donc pas un taux d'anomalie supérieur à la moyenne de la population. Quarante-huit heures avant l'interruption, du Mifégyne, un anti progestérone (RU486), est administré à la patiente et complété par du Cytotec, un analogue de la prostaglandine E, juste avant l'intervention. L'IVG est réalisée par aspiration sous anesthésie locale ou générale.

Les gonades fœtales sont prélevées dans un laboratoire de niveau L2 sous une loupe binoculaire, les fragments du fœtus sont récupérés au sein des débris d'aspiration (composés d'un mélange de sang maternel ainsi que de fragments d'endomètre et de placenta), puis les gonades sont recherchées et prélevées. Le pourcentage de récupération des gonades n'est que d'environ 50% car leur petite taille rend extrêmement difficile leur identification au sein des débris d'aspiration. Les testicules sont donc récupérés dans 25% des cas.

Nous déterminons précisément l'âge des fœtus par mesure de critères morphométriques. Nous employons en effet une version simplifiée du modèle mathématique mis au point par Evtouchenko et collaborateurs (Evtouchenko et al., 1996) basé sur la mesure de cinq paramètres morphologiques du fœtus :

- PAL = Proximal Arm Length: distance épaule-coude en mm.
- DAL = Distal Arm Length: distance coude-main en mm.
- PLL = Proximal Leg Length: distance fessier-genoux en mm.
- DLL = Distal Leg Length: distance genoux -talon en mm.
- FL = Foot Length: longueur du pied en mm.

Dans notre modèle, les deux valeurs de PLL et PAL sont souvent inaccessibles en raison de l'état fortement détérioré du fœtus après aspiration. La formule d'Evtouchenko et collaborateurs a donc été simplifiée pour n'inclure que les trois paramètres de DLL, DAL et FL. La valeur de l'âge obtenu est exprimée en jours post conception (jpc) puis convertie en semaines de gestation.

Le sexe est déterminé grâce à l'observation morphologique des gonades. En effet, le testicule présente une morphologie épaisse dont la surface est lisse et renflée avec un sillon central nettement marqué, par opposition à l'ovaire dont la structure est plus fine et les contours plus irréguliers. De même, par transparence on peut observer les cordons séminifères du testicule alors que l'ovaire présente un aspect homogène.

I.B. Prélèvement des testicules fœtaux de souris et de rat

Les rates Wistar (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) et les souris NMRI et C57BL/6 sont élevées dans notre animalerie sous contrôle photopériodique, avec une nourriture sans œstrogène *ad libitum*.

Les souris C57BL/6 hétérozygotes pour ER α (ER α +/-) (Dupont et al., 2000) ont été fournies par le Pr. P.Chambon (IGBMC, Illkirch, France). L'exon 3 du gène, codant pour le premier doigt de zinc de domaine de liaison à l'ADN, est la cible de la mutation. Les souris ER (-/-) ont été générées par croisement des hétérozygotes.

Les souris mutantes homozygotes (BAX -/-) gestantes à 12,5 jpc ont été généreusement fournies par le Dr. M.Couplier (ENVA, Maison-Alfort, France).

Le jour suivant l'accouplement est considéré comme 0,5 jour post-conception (jpc). Les souris gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale à 12,5 jpc. Les rates sont anesthésiées par injection de 4mg/ml de sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) à 14,5 jpc.

Les fœtus sont rapidement prélevés de l'utérus, disséqués sous loupe binoculaire et sexés par analyse morphologique de la gonade (Livera et al., 2006). Les gonades sont prélevées et cultivées sans le mésonéphros adjacent. L'animalerie possède une licence du ministère de l'Agriculture (n° d'agrément B92-032-02). Les expérimentations animales ont été supervisées par le Pr. Virginie Rouiller-Fabre (n° d'agrément pour l'expérimentation animale délivré par le ministère de l'Agriculture : C-92-224) en accord avec le « NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals ». Tous les efforts ont été réalisés dans le but de réduire au maximum la souffrance de l'animal.

II. CULTURE ORGANOTYPIQUE

II.A. Produits et réactifs employés

- Le milieu nutritif employé pour la culture est du Dulbecco's Modified Eagle Medium/HamF12 (Gibco ; DMEM/F12 : 1/1 v/v), supplémenté de 0,08 mg/mL de gentamycine (Sigma, St. Louis, MO). Ce milieu de culture est dépourvu de rouge de phénol (indicateur colorimétrique du pH) car ce composé peut présenter une activité œstrogénique susceptible d'interagir avec les différents perturbateurs utilisés dans cette étude.
- Le BPA (Sigma, St.Louis, MO) est dilué dans de l'éthanol en une solution intermédiaire à 10^{-1} M conservée à -20°C . Cette solution intermédiaire est ensuite diluée 10 000 fois dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10^{-5} M, puis diluée à nouveau jusqu'à la concentration souhaitée.
- Le DES (Sigma, St.Louis, MO) est dilué dans de l'éthanol en une solution intermédiaire à 10^{-3} M conservée à -20°C . Cette solution intermédiaire est ensuite diluée 100 ou 1 000 fois dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10^{-5} ou 10^{-6} M.
- Le MEHP (TCI Europe, Antwerpen, Belgique) est dilué dans du DMSO (Sigma-Aldrich) en une solution intermédiaire à 0,4M conservée à -20°C . Cette solution intermédiaire est ensuite diluée 20 000 fois dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de $2 \cdot 10^{-5}$ M.
- L'agoniste de PPAR Gamma GW1929 (Sigma, St.Louis, MO) est dilué dans une solution intermédiaire à 20 mM conservée à 4°C . Cette solution est ensuite diluée 2 000 fois dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10 μM .
- L'agoniste de PPAR Alpha GW7647 (Sigma, St.Louis, MO) est dilué dans une solution intermédiaire à 20 mM conservée à 4°C . Cette solution est ensuite diluée 2 000 fois dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10 μM .

II.B. Méthode de culture

En ce qui concerne les fœtus humains, toutes les cultures sont réalisées dans un laboratoire de niveau L2.

Les gonades sont mises en culture juste après leur prélèvement. Afin de favoriser l'oxygénation des tissus et de limiter les phénomènes de nécrose, les testicules humains sont coupés en morceaux dans du milieu de culture sous une loupe binoculaire. De part leur taille réduite aux âges étudiés, les testicules de souris et de rat peuvent être cultivés entiers. Les morceaux de testicule humains (ou les testicules de rongeur) sont placés sur des inserts Millicell-CM Biopore (Millipore, Billerica, MA) qui flottent à la surface de 320 μL de milieu

nutritif dans une plaque de culture (Nunc). L'insert comporte une membrane poreuse (pores de $0,45\mu\text{m}$) sur laquelle sont placés les explants testiculaires ce qui permet à la fois une bonne oxygénation et un apport nutritif optimal des échantillons. Les plaques de culture sont placées dans un incubateur thermostaté à 37°C dont l'atmosphère est saturée en vapeur d'eau et contenant un mélange gazeux composé de 95% d'air et 5% de CO_2 .

Durant la culture, les milieux sont renouvelés toutes les 24 heures et conservés à -20°C afin de doser ultérieurement la sécrétion de testostérone.

Le testicule humain étant un tissu hétérogène cultivé en morceaux dans plusieurs puits différents, il est difficile d'obtenir une sécrétion basale identique dans les puits contrôles et dans les puits traités. Les explants sont donc mis en culture avec un milieu témoin pendant 24h (J_0), puis traités uniquement à partir du J_1 . Ceci nous permet de rapporter le taux de sécrétion de testostérone après traitement (J_1) à un taux de sécrétion basal (J_0), pour chaque puits. Les testicules de rongeur sont cultivés entiers, il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une culture avec J_0 . Cependant, afin de comparer rigoureusement nos résultats humains avec ceux obtenus chez les rongeurs, nous avons également effectué des cultures avec un J_0 chez les rongeurs. Les résultats obtenus étaient identiques aux résultats obtenus sans J_0 .

À la fin de la culture, les organes sont fixés pour l'analyse histologique ou placés dans du tampon RLT (Qiagen) pour l'extraction d'ARN.

III. Histologie

Trois heures avant l'arrêt de la culture, 1% de BrdU à $30\mu\text{g/mL}$ (Bromo-2-Désoxy-Uridine) (Amersham) est ajouté dans le milieu pour mesurer la prolifération des cellules (Olaso et al. 1998). Les gonades sont ensuite fixées 2h à température ambiante dans du liquide de Bouin (solution d'acide picrique saturé, formol, acide acétique glacial : 75/20/5 v/v) ou une nuit à 4°C dans du formol tamponné 10%. La déshydratation se fait par bains successifs de 30min d'éthanol (70, 95, 100%) puis de butanol toute la nuit. Les pièces sont ensuite mises dans de la paraffine liquide (60°C) pendant au moins 4h puis incluses dans un bloc de paraffine. Les blocs sont coupés au microtome avec une épaisseur de coupe de 5 microns.

Une coloration à l'Hémaroxyline Eosine est réalisée sur quelques coupes pour vérifier leur état. Les coupes sont montées sur des lames Superfrost pré-traitées à l'APES (3-aminopropyltriéthoxysilane) recouvertes d'albumine glycinée diluée dans l'eau, puis déparaffinées dans une succession de bains de toluène et réhydratées progressivement par des bains de 3 min d'éthanol de concentration décroissante jusqu'à l'eau. Les lames sont

ensuite plongées 20 sec dans l'Hématoxyline (colorant nucléaire bleu), rincées à l'eau pendant 1 min, puis plongées dans l'Eosine (colorant cytoplasmique rose) et rincées à l'éthanol 100. Après une nouvelle série de bains de toluène, les lames sont montées dans la résine Eukitt.

III.A. Immunohistochimie

L'immunohistochimie permet de visualiser un élément cellulaire particulier grâce à une réaction immune. Les coupes sont déparaffinées puis réhydratées comme décrit ci-dessus. Elles sont ensuite placées dans un tampon de démasquage (tampon citrate pH 6) et portées à haute température dans un Retriver 2100 (Proteogenix, Oberhausbergen, France) afin de dénaturer les protéines et ainsi révéler les différents sites antigéniques. L'activité enzymatique des peroxydases endogènes est épuisée dans l'eau oxygénée (H₂O₂, 3%) pendant 15 min pour éviter toute réaction parasite ultérieure, puis les sites de liaison non spécifique de l'anticorps sont ensuite saturés dans du sérum bloquant (Normal horse serum 2,5%, Vector, Burlingame, CA) pendant 30 min avant que les coupes soient mises à incuber en présence de l'anticorps primaire (1h à 37°C, 2h à température ambiante ou une nuit à 4°C). Après rinçage, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (ImmPRESS Reagent Kit, Vector, Burlingame, CA) spécifique de l'anticorps primaire pendant 30min à température ambiante. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase. Les coupes sont ensuite incubées avec un substrat de la peroxydase (DAB, VIP ou HistoGreen) qui, oxydé par cette dernière, donne un produit de dégradation coloré permettant la révélation du marquage. Les lames sont ensuite montées sous lamelles pour l'observation au microscope. Les différents rinçages se font dans du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline, Gibco).

Dans le cas d'un double marquage, les coupes sont rincées dans du PBS après la première révélation, avant d'être incubées en présence du deuxième anticorps primaire. La suite du protocole est identique à celui d'un simple marquage jusqu'au montage de lames dans l'Eukitt. Pour chaque anticorps, la spécificité du marquage a été préalablement testée en réalisant une lame témoin pour laquelle l'anticorps primaire est remplacé par un IgG isotype de la même espèce.

Liste des anticorps primaires

- Caspase-3 Clivée: Anti-asp 175 (1/100, Cell Signaling, Beverly, MA)
- AMH Humaine : Anticorps polyclonal de lapin (1/8 000) (fourni par le Dr N. Di Clemente (INSERM U782, Clamart, France)
- AMH murine : Anticorps polyclonal de lapin (1/500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

- BrdU: Kit de prolifération (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
- Mouse Vasa Homologue: anticorps polyclonal de lapin (1/500; Abcam, Cambridge, UK)

III.B. Quantification de l'apoptose et de la prolifération.

La quantification se fait par calcul de pourcentage. Un certain nombre de champs d'observation sont comptés de manière à dénombrer au minimum 200 cellules germinales (dont au moins 20 cellules germinales apoptotiques dans le cas d'un marquage caspase-3 clivée) sur 3 coupes différentes, puis le pourcentage de cellules positives pour le marquage caspase-3 clivée ou BrdU est calculé pour estimer le taux d'apoptose ou de prolifération.

IV. Analyse d'expression de gène

IV.A. Extraction d'ARN

Les explants sont récupérés dans des tubes contenant du tampon RLT, 1% de β -mercapto-éthanol et des billes de céramique de 1,4 mm de diamètre (MP-Bio). Ils sont ensuite lysés par vibration dans un homogénéisateur FastPrep-24 (MP-bio). L'extraction des ARNs totaux est ensuite réalisée en utilisant les kits Rneasy mini (Qiagen). Les ARNs ainsi extraits sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Labtech, France) qui permet également d'évaluer la contamination protéique des échantillons. La rétrotranscription des ARNs en ADNc est réalisée en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) selon les recommandations du fabricant. Les ARNs extraits d'échantillons de gonade entière sont rétrotranscrits 200ng d'ARN dans 20 μ L final.

IV.B. Real Time quantitative PCR (RTqPCR)

Deux types d'amorces ont été utilisés dans ces études : une partie a été dessinée en utilisant le logiciel *Primer Express 2.0* et synthétisée par Eurogentec avec une sonde SYBR, l'autre partie a été obtenue auprès d'Applied Biosystems avec une sonde TaqMan. Dans le cas des amorces dessinées par Eurogentec, l'efficacité de chaque couple est testée sur une gamme de concentration d'échantillon d'ADNc afin de s'assurer qu'elle est comprise entre 95 et 105%, puis les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose pour vérifier la spécificité de la réaction (un seul produit d'amplification).

Les qPCR sont réalisées dans une plaque 96 puits avec un volume final de 20µL par puits selon le protocole suivant :

- Amorces pour sonde SYBR :

- SYBR green Master Mix (2X) : 10µL
- Amorce Sens (10µM) : 0,5µL
- Amorce Antisens (10µM) : 0,5µL
- ADNc (Dilution minimum 1/10) : 9µL

- Amorces pour sonde TaqMan :

- TaqMan Gene Expression Master Mix (2X) : 10µL
- Amorce (Sens et Antisens) : 1µL
- ADNc (Dilution minimum 1/10) : 9µL

Listes des amorces pour sonde Taqman :

Amorces	Humain	Souris
P4450C17a1	Hs00164375_m1	Mm00484040_m1
StAR	Hs00264912_m1	Mm00441558_m1
P450sc	Hs00167984_m1	Mm00490735_m1
3-β-HSD	Hs00426435_m1	-
InsI3	Hs01394273_m1	Mm01340353_m1 (rat : Rn00586632_m1)

Listes des amorces pour sonde SYBR :

Amorces	Humain	Souris	Rat
β-actine	NM_001101.2	NM_007393.3	NM_031144.2
Stra8	-	F 5'-GCCTGGAGACCTTTGACGA-3' R 5'-GGCTTTTGGAAGCAGCCTTT-3'	-

La *β-actine* a été utilisée comme gène de référence après avoir testé différents gènes grâce au programme geNorm. Le programme permet de comparer la stabilité de plusieurs gènes après un traitement donné. Nous avons mesuré la stabilité de plusieurs gènes, les trois gènes apparaissant comme les plus stables après traitement au BPA étaient la *β-actine*, *SDHA* (succinate dehydrogenase complex, subunit A) et *MAPK1* (mitogen-activated protein

kinase 1). Nous avons donc choisi le gène de la *β-actine* comme référence dans nos expériences de RTqPCR.

L'acquisition de la fluorescence et l'analyse des données sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) et de son logiciel adapté. Le protocole de PCR en temps réel compte 40 cycles pour une température d'hybridation de 60°C suivi, dans le cas des amorces SYBR, d'une étape de dissociation afin de vérifier que le produit de réaction est unique.

Les résultats ont été exprimés en utilisant la méthode des $\Delta\Delta CT$. L'appareil indique le premier cycle (CT) au cours duquel il a détecté une amplification significative de la fluorescence. Après soustraction du CT du gène d'intérêt et du CT du gène de référence du témoin et du traité, on obtient le ΔCT . La différence des ΔCT entre témoin et traité permet d'obtenir le $\Delta\Delta CT$, qui reflète la différence du nombre de cycles d'amplification nécessaires pour obtenir la même quantité d'ADNc pour le témoin et le traité. En utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta CT}$, nous pouvons calculer la quantité relative d'ARNm initiaux pour un gène spécifique chez le traité par rapport au témoin. Des témoins sont réalisés avec les échantillons de RT qui ne contiennent que de l'eau et pas d'ADNc et qui, par conséquent, ne seront pas amplifiés.

IV.C. Analyse transcriptomique

Dans le cadre de notre analyse transcriptomique, les testicules fœtaux murins de 12,5 jpc ont été cultivés pendant 6 heures en présence de BPA à la dose de 10^{-7} M, ou en présence d'éthanol ($10^{-5}\%$). L'extraction d'ARN a été réalisée sur des pools de 10 gonades selon le protocole d'extraction du paragraphe (IV.A).

Après vérification de la qualité des cDNA, l'amplification est réalisée sur des « flow cell » selon le système de séquençage Illumina. Brièvement, les séquences sont amplifiées par ajout de nucléotides fluorescents sur chaque ligne du « flow cell ». 46 000 séquences correspondant à 35 000 gènes ont été amplifiées. La fluorescence émise est alors mesurée pour chaque séquence amplifiée. Notre expérience a été réalisée sur quatre échantillons témoins et quatre échantillons traités différents. Dans avons alors relevé et classé les séquences différentiellement exprimées après traitement au BPA.

V. Dosage radioimmunologique de la testostérone

La méthode de dosage utilisée est celle décrite par Picon (Picon, 1976). Les échantillons de milieux (dilués en fonction du temps de culture et de l'âge de l'échantillon) sont incubés 3h à 4°C en présence de l'anticorps anti-testostérone (obtenu par immunisation de lapin contre la

3-carboxy-méthoxine-sérum-albumine bovine, COVALAB) dans un tampon phosphate. Ils sont ensuite incubés pendant 2h en présence de l'hormone radioactive ([1, 2, 6, 7-3H] testostérone, Amersham, France). Les fractions libres et liées à l'anticorps sont séparées par du charbon-dextran. La radioactivité présente dans la fraction liée est mesurée dans un compteur β après addition de liquide scintillant.

La limite de sensibilité du dosage est de 80 pg/mL, le coefficient de variation intradosage est de 6% et le coefficient de variation interdosage de 11%. L'anticorps anti-testostérone ne présente de réaction croisée (64%) qu'avec la dihydrotestostérone (DHT). Toutefois, cette production de DHT par le testicule fœtal humain est négligeable (George et al., 1987).

Afin de satisfaire aux conditions optimales de la culture organotypique, chaque testicule est coupé en morceaux et réparti sur plusieurs inserts, il est donc impossible de comparer directement la production de testostérone par insert en raison de la différence de taille des morceaux ainsi que de l'hétérogénéité de l'organe. Pour palier à ce problème, les gonades sont d'abord cultivées 24h sans traitement, la mesure de testostérone obtenue pour ces 24h permet d'obtenir un point de référence identique pour chaque insert. La production de testostérone au cours du traitement est ensuite normalisée par rapport à la valeur de ce J0.

VI. Analyses statistiques

Le logiciel Instat 3 a été utilisé pour réaliser les tests statistiques. En raison du faible nombre d'échantillons ($n < 30$), il est impossible d'appliquer la loi normale et par conséquent de réaliser des tests paramétriques. La significativité des différences entre les valeurs moyennes relevées dans les échantillons traités par rapport aux échantillons témoins est évaluée par le test apparié non paramétrique de Wilcoxon.

RESULTATS

Article n°1

Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal Leydig cell function

Thierry N'Tumba-Byn, Delphine Moison, Marlène Lacroix, Charlotte Lecureuil, Laëtitia Lesage, Sophie M. Prud'homme, Stéphanie Pozzi-Gaudin, René Frydman, Alexandra Benachi, Gabriel Livera, Virginie Rouiller-Fabre and René Habert*.*

Plusieurs études concernant les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement du testicule fœtal ont été réalisées dans notre laboratoire. Chez les rongeurs et aussi chez l'Homme, les effets du cadmium, de l'uranium, et des phtalates ont été examinés (Angenard et al., 2011, Angenard et al., 2010, Lambrot et al., 2009, Lehraiki et al., 2009, Muczynski et al., 2012a). Le bisphénol A (BPA) est considéré comme un perturbateur endocrinien œstrogène-mimétique, qui comme le diéthylstilbestrol (DES), posséderait des capacités œstrogéniques et anti-androgéniques, en exerçant son action via les récepteurs des œstrogènes. Largement étudié dans la littérature, les effets du BPA sur les fonctions du testicule fœtal sont pourtant incertains. De nombreuses études ont été réalisées chez les rongeurs, avec des conclusions variables. De plus, aucune étude n'a été réalisée sur le testicule fœtal humain. Nous avons donc décidé d'étudier les effets du BPA sur le développement du testicule fœtal durant la période critique de mise en place des fonctions testiculaires chez l'Homme.

Grâce à la collaboration établie depuis plusieurs années entre notre laboratoire et le service de gynécologie-obstétrique de l'hôpital Antoine Bécclère, nous avons effectué une étude sur les testicules de fœtus humains issus d'interruptions volontaires de grossesse au premier trimestre de grossesse, plus précisément entre 6,5 et 10,5 semaines de gestation. Cette période correspond à la période de mise en place des fonctions de masculinisation du testicule (Rouiller-Fabre et al., 2008, Scott et al., 2009). A ce stade de développement apparaissent les cellules de Leydig, qui sécrètent la testostérone, et les cordons séminifères, formés par les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Cette fenêtre de développement est donc particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens (Welsh et al., 2008).

Afin de renforcer les données obtenues dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des concentrations de BPA semblables aux doses retrouvées dans les fluides biologiques dans la population. Les études les plus récentes ont démontré que le BPA est retrouvé dans le

sang et l'urine de la grande majorité des populations adultes occidentales, à des concentrations moyennes d'environ 10^{-8} M (Vandenberg et al., 2010).

Pour disposer d'un modèle de comparaison entre notre étude chez l'Homme et les données expérimentales disponibles chez les rongeurs, nos expériences ont été réalisées dans 3 espèces, selon un protocole expérimental comparable. L'étude a été effectuée chez la souris, sur des testicules fœtaux de 12,5 jpc, chez le rat, à 14,5 jpc et chez l'Homme, entre 6,5 et 10,5 semaines de gestation.

De plus, nos expériences ont également été réalisées en présence de DES, perturbateur endocrinien dont les effets et mécanismes d'action sont connus (Delbes et al., 2005), nous permettant de les comparer à ceux du BPA.

Dans ce travail, nous avons focalisé notre étude sur la stéroïdogénèse et sur les fonctions sécrétoires des cellules de Leydig.

Grâce au modèle de culture organotypique développé dans notre laboratoire (Lambrot et al., 2006a, Livera et al., 2006), les testicules fœtaux des trois espèces sont cultivés pendant 3 jours, en présence ou en absence de BPA ou de DES. Les milieux de culture sont récupérés toutes les 24h afin d'effectuer un dosage radioimmunologique du taux de testostérone sécrétée par la gonade. En fin de culture les gonades sont récupérées afin d'effectuer des mesures de niveau d'expression de gènes par qPCR. Nos résultats s'articulent autour de trois données majeures. Concernant la sécrétion de testostérone, nous observons qu'après traitement au BPA à 10^{-5} M, la sécrétion de testostérone est significativement diminuée dans les 3 espèces, dès le premier jour de culture. En revanche, à la dose de 10^{-8} M, plus proche des concentrations environnementales, la sécrétion de testostérone est altérée uniquement dans le testicule fœtal humain. D'autre part, nous avons également mesuré le niveau d'expression de l'*Insl-3*, protéine sécrétée par les cellules de Leydig fœtales, et impliquée dans les processus de masculinisation, comme la testostérone. A la faible dose de 10^{-8} M, l'expression du gène de l'*Insl-3* est significativement plus faible en présence de BPA chez l'Homme, mais pas chez les rongeurs. Enfin, nos expériences réalisées en présence de DES montrent que ce dernier n'a aucun effet sur la sécrétion de testostérone chez l'Homme, alors qu'il l'altère de façon significative chez les rongeurs.

Ainsi, nous démontrons à travers cette étude que le testicule fœtal humain posséderait une sensibilité plus grande à la perturbation endocrinienne du BPA, que les rongeurs. Ceci soulève la question de l'extrapolation à l'Homme de résultats d'études expérimentales réalisées chez l'animal. De plus, nous mettons en évidence la différence d'effet entre le BPA et le DES, perturbateurs ayant pourtant tous les deux des propriétés xéno-œstrogéniques.

Les mécanismes d'action du DES étant connus, nos résultats suggèrent que le BPA agirait par des voies de signalisation différentes de celles du DES, via des récepteurs autres que les récepteurs classiques des œstrogènes.

Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function

Thierry N'Tumba-Byn^{1,2,3}, Delphine Moison^{1,2,3}, Marlène Lacroix⁴, Charlotte Lecureuil^{1,2,3}, Laëticia Lesage^{1,2,3}, Sophie M. Prud'homme^{1,2,3}, Stéphanie Pozzi-Gaudin⁵, René Frydman⁵, Alexandra Benachi⁵, Gabriel Livera^{1,2,3}, Virginie Rouiller-Fabre^{1,2,3,9}, René Habert^{1,2,3,9}

1 Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Stem Cells and Radiation, Fontenay-aux-Roses, France, **2** CEA, DSV, IRCM, SCSR, LDG, Fontenay-aux-Roses, France, **3** INSERM, Unité 967, Fontenay aux Roses, France, **4** INRA, UMR1331, TOXALIM, Toulouse, France, **5** Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital A. Bécère, Université Paris Sud, Clamart, France

Abstract

Endocrine disruptors (ED) have been incriminated in the current increase of male reproductive alterations. Bisphenol A (BPA) is a widely used weak estrogenic environmental ED and it is debated whether BPA concentrations within the average internal exposure are toxic. In the present study we investigated the effects of 10^{-12} to 10^{-5} M BPA concentrations on fetal Leydig cell function, as fetal life is a critical period of sensitivity to ED effects on male reproductive function. To this aim, fetal testes from human at 6.5–10.5 gestational weeks (GW) or from rat and mouse at a comparable critical period of development (14.5 days post-coitum (dpc) for rat and 12.5 dpc for mouse) were explanted and cultured using our validated organotypic culture system in the presence or absence of BPA for 1–3 days. BPA concentrations as low as 10^{-8} M reduced testosterone secretion by human testes from day 1 of culture onwards, but not by mouse and rat testes where concentrations equal to 10^{-5} M BPA were required. Similarly, 10^{-8} M BPA reduced *INSL3* mRNA levels only in human cultured testes. On the contrary, 10^{-5} and 10^{-6} M diethylstilbestrol (DES), a classical estrogenic compound, affected testosterone secretion only in rat and mouse testis cultures, but not in human testis cultures. Lastly, contrarily to the DES effect, the negative effect of BPA on testosterone produced by the mouse fetal testis was maintained after invalidation of estrogen receptor α (ER α). In conclusion, these results evidenced i) a deleterious effect of BPA on fetal Leydig cells function in human for concentrations from 10^{-8} M upwards, ii) species-specific differences raising concerns about extrapolation of data from rodent studies to human risk assessment, iii) a specific signaling pathway for BPA which differs from the DES one and which does not involve ER α .

Citation: N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, et al. (2012) Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. PLoS ONE 7(12): e51579. doi:10.1371/journal.pone.0051579

Editor: Joel R. Drevet, Clermont-Ferrand Univ., France

Received: June 28, 2012; **Accepted:** November 1, 2012; **Published:** December 17, 2012

Copyright: © 2012 N'Tumba-Byn et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail [ANSES contrat EST62010/2/046], by the Agence Nationale de la Recherche [ANR, contrat MECABPA] and by the Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement [Programme ANTIOPEs – Storm]. It was also supported by Université Paris Diderot, INSERM and CEA. Thierry N'Tumba-Byn holds a fellowship from the Région Ile-de-France (DIM Santé-Environnement-Toxicologie). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rene.habert@cea.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Concerns about the increasing incidence of abnormalities in human and animal male reproductive function, such as cryptorchidism, hypospadias, low sperm count and testicular germ cell cancer, have been steadily increasing [1,2]. These disorders have been hypothesized to be the expression of one common underlying disorder, the testicular dysgenesis syndrome (TDS) that arises during fetal life [3,4]. Specifically, the higher occurrence of cryptorchidism and hypospadias might be the result of increasing alterations of the function of fetal Leydig cells. Indeed, Leydig cells produce testosterone that is responsible for the masculinization of the male urogenital system and external genitalia [5–8]. Moreover, fetal testis migration into the scrotum is dependent on testosterone and Insulin-like 3 (INSL3), a hormone produced by Leydig cells [9,10]. An important finding in relation to TDS is that androgen action during the “masculinization programming window”, which

extends from 15.5 days post-conception (dpc) to 18.5 dpc in the rat, (equivalent of 13 to 17.5 dpc in the mouse and estimated to be from 6.5 to 14 gestational week (GW) in human) is essential for normal phenotypic masculinization [11,12].

Since the initial “estrogenic hypothesis” proposed by Sharpe and Skakkebaek, several findings have suggested a link between deterioration of reproductive health and environmental factors, particularly endocrine disruptors (EDs), that have been quantitatively and qualitatively increasing in our environment during the last decades [3,6,7,13].

Among such EDs, the estrogenic activity of bisphenol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) has been the focus of considerable research effort and discussion about its toxicity at low doses [14–17]. BPA is a widely used and produced organic compound (about 3.5 million tons manufactured worldwide in 2008). Currently, it is used as monomer for the industrial

production by polymerization of polycarbonate plastic (72%) and epoxy resins (21%), and as anti-oxidant or inhibitor of polymerization in some plasticizers and PVC (7%) [18]. BPA can leach into the content of food containers made of polycarbonate plastic or coated with epoxy resins and it is then ingested [18]. This is the main source of contamination, although its ubiquitous distribution leads also to contamination from dermal exposure and inhalation of household dusts.

Data on the effect of BPA on fetal Leydig cell function are limited. Exposure to high doses of BPA during pregnancy reduced plasma testosterone at birth and increased expression of *Raf1*, which is predominant in Leydig cells, at postnatal day 3 in the rat [19,20]. Administration of doses 5 times higher than the recommended tolerable daily intake (*i.e.*, 50 $\mu\text{g/kg/day}$) to pregnant rats reduced the anogenital distance in male pups, whereas lower BPA doses did not have any effect [21]. On the contrary, three other independent studies didn't show any effect of BPA on AGD after a gestational gavage with 2–200 $\mu\text{g/kg/day}$, 4000–40000 $\mu\text{g/kg/day}$ and 1–50000 $\mu\text{g/kg/day}$ respectively [22–24]. In humans, a recent retrospective epidemiological study highlighted that sons of workers who were professionally exposed to high levels of BPA during pregnancy had shorter AGD [25]. However, no increase in BPA concentration in umbilical cord blood was observed in newborns with cryptorchidism [26].

In the 1990s, we developed an organotypic culture system for fetal testis from rats on floating filters in which the testis architecture and intercellular communications are preserved enough to allow reproducing the normal development of testis somatic and germ cells *in vitro* without addition of exogenous signaling factors [27–30]. We have then extended this methodology to the culture of mouse and human fetal testes [31,32]. We proposed this organotypic culture system as a method to study the direct effects of potential EDs on fetal testicular functions and development under the name of rat, mouse and human Fetal Testis Assay (r/m/h FeTA) [6,31,33]. This experimental approach has already been employed to evaluate the effect of different potential EDs, such as DES [34,35], mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) [36–39], cadmium [40], mild analgesics [41] and genistein [42] on the fetal development of different cell types in both rodent and human testes. Recently, we further validated this organotypic culture system as a highly valuable model for toxicological assay by showing that it reproduces the *in vivo* observed effects of one phthalate on the mouse fetal testis development [39].

Using FeTA, here we evaluated the effect of different concentrations of BPA on human Leydig cell endocrine functions through quantification of testosterone secretion in the culture medium and of *INSL3* mRNA levels in the testis. We then compared these effects with those observed in rat and mouse fetal testes, which are classically used in toxicological studies. Finally we compared the BPA effects with those of diethylstilbestrol (DES), an estrogenic compound that is used as a positive control for BPA, in the three species and also in mouse invalidated for Estrogen Receptor α (*ER α*) to investigate the role of this receptor in BPA-signaling.

Materials and Methods

Animals

Wistar rats from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) and NMRI and C57BL/6 mice bred in our animal facility were housed under controlled photoperiod conditions (lights from 08:00 to 20:00 h) and were supplied with estrogen-free commercial food and tap water *ad libitum*.

C57BL/6 mice heterozygous for *ER α* (*ER α* +/-) were produced by Dupont et al. [43] and generously provided by Prof. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France). Exon 3 of this gene, encoding the first zinc finger of the DNA-binding domain, was targeted for disruption. We generated mice homozygous for *ER α* (*ER α* -/-) by caging heterozygous males with heterozygous females.

The day after overnight mating was counted as 0.5 day post-conception (dpc). Pregnant mice were killed by cervical dislocation at 12.5 dpc and pregnant rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 4 mg/ml sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) at 14.5 dpc. Fetuses were quickly removed from the uterus, dissected under a binocular microscope and sexed based on the gonad morphology as previously described [31]. Testes were removed without the adjacent mesonephros.

The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N°B92-032-02). All animal experiments were supervised by Pr. René Habert (agreement delivered by the French Ministry of Agriculture for animal experiment N°92-191) in compliance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering.

Collection of Human Fetal Testes

Human fetal testes from the 6th until the 11th GW were obtained from pregnant women referred to the Department of Obstetrics and Gynecology at the Antoine Bécélère Hospital, Clamart (France) for legally induced abortions in the first trimester of pregnancy as previously described [32]. All pregnant women provided their written informed consent for scientific use of the fetuses. None of the terminations were due to fetal abnormality. Fetuses were dissected under a binocular microscope. The fetal age was evaluated by measuring the length of limbs and feet [44]. Gonads within the abortive material were retrieved in approximately 50% of cases. Testes were identified based on their morphology. The project was approved by the local Medical Ethics Committee and by the French Biomedecine Agency (reference number PFS12-002).

Organ Cultures

The organotypic culture system was previously described [27,31,32]. Briefly, human, rat and mouse testes were cultured on Millicell-CM Biopore membranes (pore size 0.4 μm , Millipore, Billerica, MA) floating on 320 μL culture medium in tissue culture dishes at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air/5% CO₂. The culture medium was phenol-red free Dulbecco modified Eagle medium/Ham F12 (1:1) (Gibco, Grand Island, NY), supplemented with 80 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin (Sigma, St. Louis, MO). BPA and DES were purchased from Sigma (Sigma, St. Louis, MO) and diluted in ethanol. The whole culture medium was changed every 24 h.

For mouse and rat, one entire testis was placed on the membrane. For human, each testis was cut into small pieces due to their larger size (12 to 36 pieces depending on the age of the testis) and 3–4 pieces were randomly placed on the membrane providing 4 to 8 wells per testis. Thus, the size of the explants was comparable for the 3 species.

For evaluating the effects of BPA or DES on testosterone secretion, in human one testis per fetus was used. Explants were first cultured in control culture medium for 24 h (D0). Then the culture were pursued for 3 days (D1 to D3) with half of the wells added with BPA or DES and the other half in basal medium to serve as controls. For each well, the D1 to D3 testosterone secretion in the medium was normalized to its basal secretion at

D0. Then, the average of the normalized secretion of the treated explants was divided by that of untreated explants to obtain the “relative secretion”. This protocol has been previously validated [32,37,40]. For rat and mouse, the protocol was identical except that for each fetus, one entire testis was treated with BPA or DES, whereas the other one was left untreated and served as control.

For assessing the effect of BPA on *INSL3* expression, one testis (mouse and rat) or the pool of all the pieces from one testis (human) cultured in the presence of BPA was compared with the untreated contralateral testis (mouse and rat) or the pool of all the pieces from the untreated contralateral testis (human).

As BPA in the culture dishes can leach in the medium [45], we measured the BPA concentration in the medium before and after culture by using the LC/MS method developed for biological fluids [46]. Culture medium samples were directly assayed after dilution (1:1) with the internal standard solution (200 ng/mL BPA-d-16 in AcN). The limit of sensitivity was 1 ng/mL ($4.38 \cdot 10^{-9}$ M BPA). No BPA was detected in control samples (no BPA added) before and after culture, whereas the expected concentrations of BPA were detected in treated samples.

Histology

At the end of the culture some explants were fixed for 2 h at 4°C in Bouin’s fluid. After dehydration in absolute ethanol and 1-butanol the tissue pieces were embedded in paraffin wax and sectioned at 5 µm thickness. The sections were mounted on slides, deparaffined, rehydrated and stained with hematoxylin as previously described [28].

Testosterone Radioimmunoassay

We measured the amount of testosterone secreted into the culture medium every 24 hours by radioimmunoassay as previously described [47]. The limit of detection was 8 pg/100 µL. The intra-assay coefficient of variation (CoV) is 2% and inter-assay CoV is 5%.

RNA Extraction, Reverse Transcription and Real-Time Polymerase Chain Reaction

Explants were frozen in RLT buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France) at the end of the culture period and stored at −20°C. Total RNA from frozen samples was extracted using the RNeasy Plus Mini-Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), followed by real-time PCR as previously described [32]. Primers and probes were designed by Applied Biosystems (sequences not provided: human *β-Actin*, NM_001101.2; mouse *β-Actin*, NM_007393.3; rat *β-Actin*, NM_031144.2; human *INSL3*, Hs01394273_m1; mouse *Insl3*, Mm01340353_m1; rat *Insl3*, Rn00586632_m1). Reactions were carried out and fluorescence detected using an ABI Prism 7900 apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Each sample was run in duplicate. Negative controls were run for every primer/probe combination. The measured amount of cDNA for *Insl3* was normalized to *β-Actin*.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean ± SEM. The significance of the differences between mean values of treated and untreated explants was evaluated using the Wilcoxon’s non-parametric paired test. The statistical comparison between basal testosterone secretion values from ERα+/+, ERα+/-, ERα-/- animals was performed with the Mann-Whitney’s non-parametric unpaired test.

Results

Effect of BPA on Fetal Testis Morphology

After culture in presence of 10^{-5} M BPA, the architecture of the testis was well maintained (Fig. 1). The testicular morphology, with the Sertoli cells surrounding the germ cells in the seminiferous cords and the Leydig cells in the interstitial compartment, was not altered by BPA treatment. We observed no sign of necrosis or disorganized areas in the tissue.

Effect of BPA on Human Fetal Testis Steroidogenesis

To investigate whether low doses of BPA could affect the activity of human fetal Leydig cells, organotypic cultures of human fetal (6.5–10.5 gestational weeks (GW)) testes were exposed to various BPA concentrations (from 10^{-12} to 10^{-5} M) for three days and testosterone secretion in the medium was quantified. Testosterone secretion was unaffected by 10^{-12} M BPA. Conversely, a BPA concentration as low as 10^{-8} M was enough to significantly decrease by 20% testosterone secretion during the first day of exposure (D1), with a maximum effect from D2 onwards (−30%) (Fig. 2).

The amount of testosterone secreted in the medium was largely dependent on the developmental stage as previously reported [32]. Specifically, at D0 (before addition of BPA), testes explanted at 6.5–7.4, 7.5–8.4, 8.5–9.4 and 9.5–10.5 GW secreted 252 ± 83 pg/h (n = 5), 2721 ± 1016 pg/h (n = 7), 5363 ± 1038 pg/h (n = 10) and 13879 ± 4231 pg/h (n = 5) of testosterone, respectively. Conversely, the effect of BPA on testosterone secretion was not influenced by the age of the fetus (Fig. 3).

Effect of BPA on Rat and Mouse Fetal Testis Steroidogenesis

The same experiment was then carried out using testes from rat and NMRI mouse fetuses at a developmental stage that was comparable to that of the human testes (i.e., 14.5 for rat and 12.5 dpc for mouse). Differently from human testes, only the highest BPA concentration tested (10^{-5} M) altered testosterone production in the rat and mouse testes, while concentrations equal to or lower than 10^{-7} M had no effect even after 3 days of treatment (Fig. 4). Indeed, in rat, testosterone secretion rate was 95 ± 15 pg/testis/h at D2 of treatment with 10^{-7} M BPA and 104 ± 8 pg/testis/h in control cultures (untreated testes) (n = 9). In mouse, the testosterone secretion rate was 53 ± 9 pg/testis/h at D2 of treatment with 10^{-7} M BPA and 49 ± 11 pg/testis/h in control cultures (untreated testes) (n = 6).

These results indicate that the steroidogenic function of fetal testis is more sensitive to BPA in humans than in rodents.

Effect of BPA on INSL3 mRNA Level

For each human, rat and NMRI mouse fetus, one testis was cultured in the presence of 10^{-8} M BPA for 24 h and the contralateral in its absence (control). This treatment reduced *INSL3* mRNA level only in human testes (by more than 20%), but not in rat and mouse testes (Fig. 5). Because, there was no effect in mouse and rat, we tested the effect of a higher concentration of BPA in the mouse. We observed that 10^{-5} M BPA induced a significant decrease in the *Insl3* mRNA level by around 20% (data not shown).

DES Effect on Fetal Testis Steroidogenesis

DES is commonly used as a positive control when assessing the estrogenic effects of EDs, particularly BPA. Surprisingly, addition of 10^{-5} or 10^{-6} M DES did not significantly modify testosterone

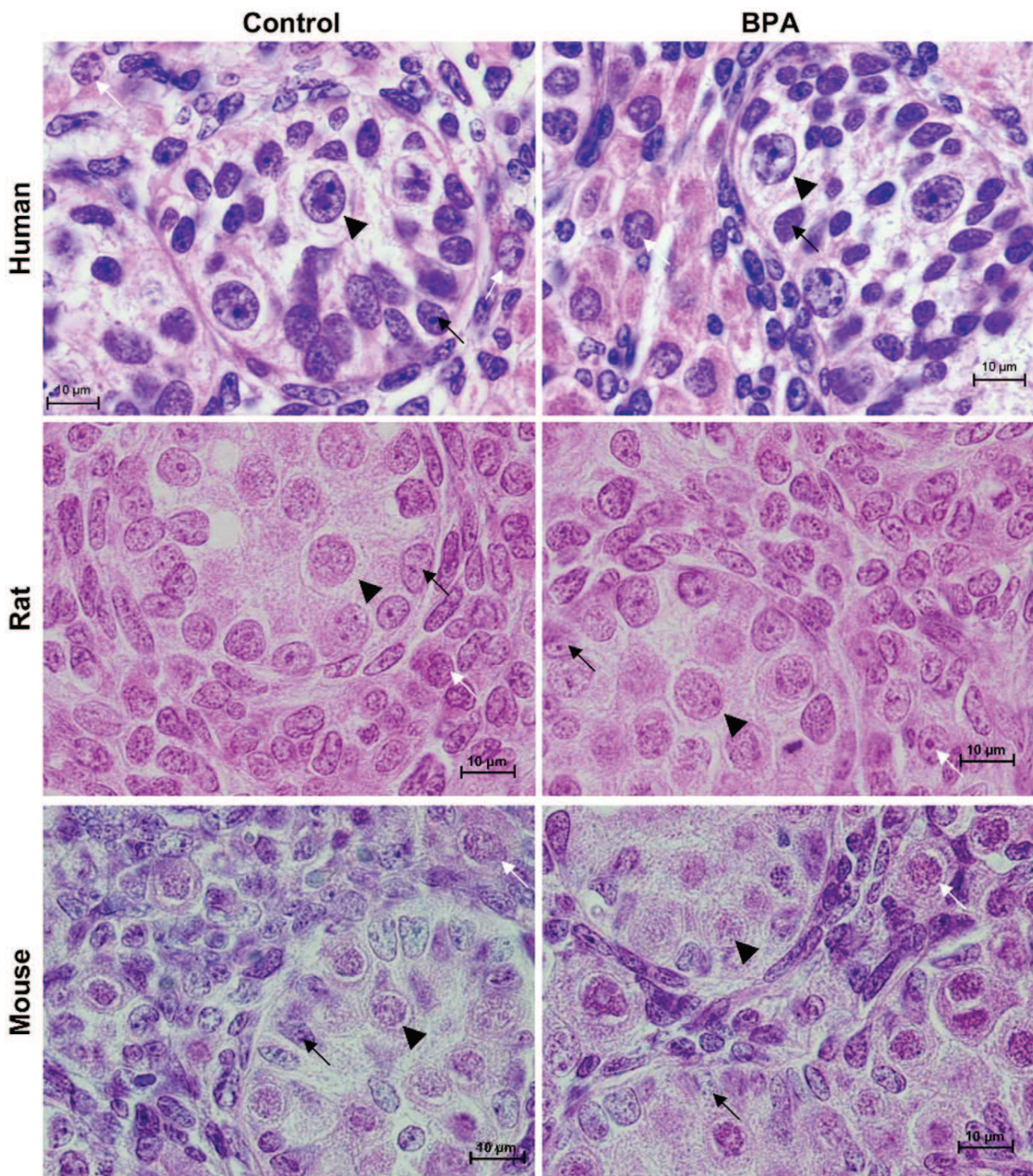


Figure 1. Effect of BPA treatment on testicular histology. Histological sections of human, rat and mouse fetal testes removed at 11 gestational week (GW), 14.5 day post conception (dpc) and 12.5 dpc respectively after one day of culture in control medium (D0) followed by 3 days of culture in the absence (control) or presence (BPA) of 10^{-5} M BPA. At the end of the culture, testes were fixed in Bouin's fluid and hematoxylin/eosin staining of the histological sections was performed. The testicular architecture and morphology were not affected by BPA-treatment. Black arrows: Sertoli cells; white arrows: Leydig cells; arrowhead: gonocytes.
doi:10.1371/journal.pone.0051579.g001

production by human fetal testes in culture (Fig. 6). Conversely, testosterone secretion by 14.5 dpc rat fetal testes and by 12.5 dpc mouse testis was significantly reduced by addition of 10^{-5} M and

10^{-6} M DES (Fig. 6) as we previously reported using cultured fetal rat (14.5 dpc) and mouse (13.5 dpc) testes [34,48].

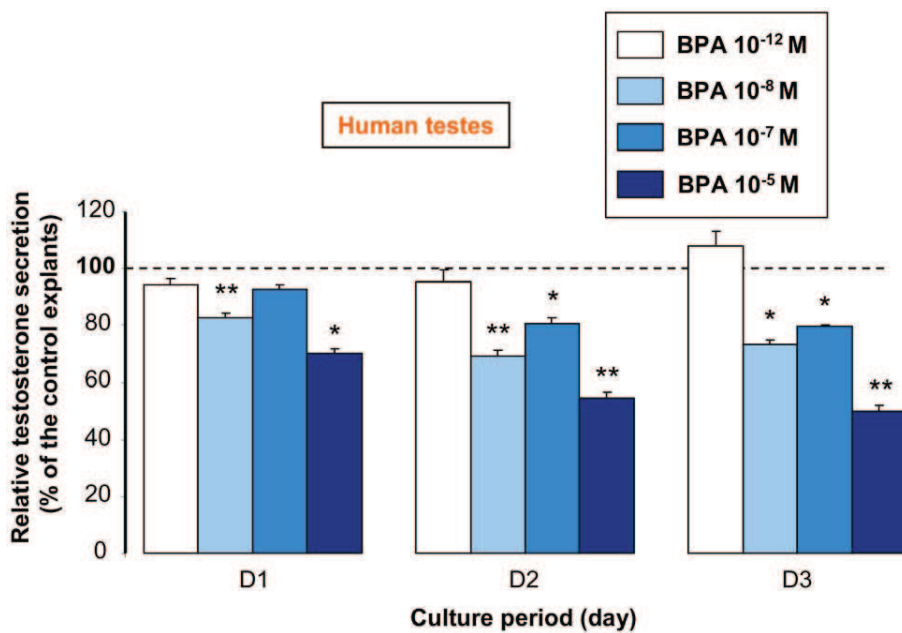


Figure 2. Effect of BPA on testosterone secretion by human fetal testes. One testis per fetus (between 6.5 and 10.5 gestational week) was cut in different pieces that were cultured as separated explants in different wells (4 to 12 wells according to the age of the fetus). After 24 h of culture in control medium (D0), half of the explants were cultured in the absence (control) and the other half in the presence of BPA at concentrations ranging from 10^{-12} M to 10^{-5} M for 3 days (D1 to D3). The daily testosterone secretion in treated and untreated samples was measured by radioimmunoassay and the values at D1 to D3 were normalized to the D0 secretion of the same well. The D1 to D3 mean normalized secretion of treated samples are expressed as the percentage of that of the controls (untreated samples). Means $\pm$ SEM of these percentages from n fetuses are presented. $n=5$ for 10^{-12} M BPA, $n=7-8$ for the other BPA concentrations. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ in the statistical comparison between BPA-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test.
doi:10.1371/journal.pone.0051579.g002

Effect of BPA on Mouse Fetal Steroidogenesis with Invalidation of ER α

We have previously studied the importance of ER α signaling in the effect of DES on mouse fetal steroidogenesis by comparing the

amounts of testosterone secreted during 2 days by testes issued from ER $\alpha^{-/-}$, ER $\alpha^{+/-}$ and ER $\alpha^{+/+}$ C57BL/6 mouse fetuses and cultured in the presence or absence of DES [48]. We reported that the negative effect of DES was abolished after invalidation of ER α . We used here the same mice and the same protocol (*i.e.*

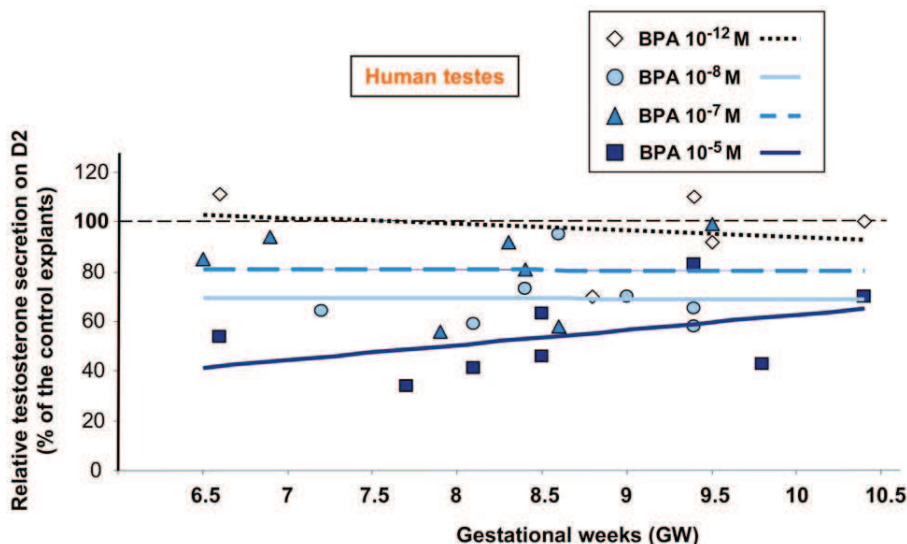


Figure 3. Effect of BPA on testosterone secretion by human fetal testes as a function of their developmental stage. Individual (normalized to D0 and expressed as the percentage of the control explants) values at D2 of culture for the samples of the experiment described in Figure 2 are presented. GW: gestational week.
doi:10.1371/journal.pone.0051579.g003

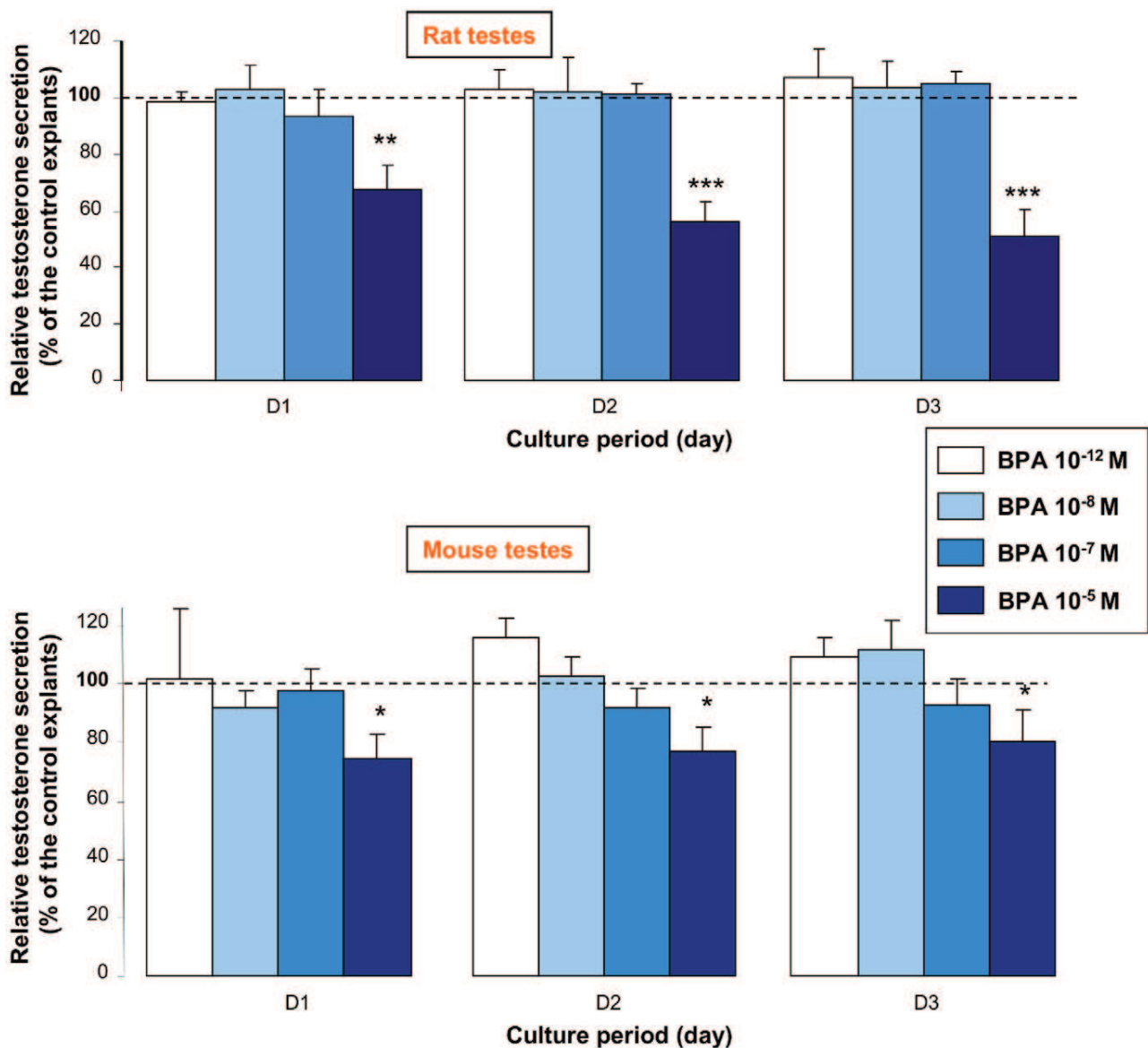


Figure 4. Effect of BPA on testosterone secretion by rat and mouse fetal testes. Testes were removed from 14.5 dpc rat and 12.5 dpc mouse fetuses and cultured for one day in control medium (D0). Then, for each fetus, one testis was kept in control medium and the other one in medium supplemented with various concentrations of BPA as indicated for 3 days (D1 to D3). Values were calculated and expressed as in Figure 1; Rat: $n=9$ for 10^{-12} M, $n=12$ for 10^{-8} M, $n=9$ for 10^{-7} M, and $n=7$ for 10^{-5} M. Mouse: $n=9$ for 10^{-12} M, $n=15$ for 10^{-8} M, $n=17$ for 10^{-7} M and $n=10$ for 10^{-5} M. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ in the statistical comparison between BPA-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test. doi:10.1371/journal.pone.0051579.g004

without D0 preculture) to investigate the ER α involvement in the effect of BPA.

First, as previously reported [48], we observed that the testosterone production in basal medium was much higher with ER α ^{-/-} animals (87.5 pg/testis/h, $n=5$) than with wild-type animals (21.4 pg/testis/h, $n=6$) ($p<0.01$ using Mann-Whitney's non-parametric unpaired test). ER α ^{+/-} animals, that have only half the amount of ER α protein found in wild-type animal, produced amounts of testosterone intermediate between wild type and ER α ^{-/-} (38.3 pg/testis/h, $n=13$) ($p<0.01$ in comparison with ER α ^{-/-} and ER α ^{+/+} using Mann-Whitney's non-parametric unpaired test). These results confirm that the estrogens endogenously produced by the cultured fetal testis inhibit

testosterone production via ER α . Interestingly these results are positive controls in this experimental series for assessing the effects of BPA.

We observed that 10^{-5} M BPA reduced testosterone production with testes from ER α ^{-/-} as well as with ER α ^{+/-} or ER α ^{+/+} fetuses suggesting that ER α is not necessary for BPA action (Fig. 7).

Discussion

I - Concentrations of BPA from 10^{-8} M Upwards Affect the Function of Human Fetal Leydig Cells

BPA concentration in biological fluids has been extensively evaluated. BPA is mostly metabolized into BPA glucuronide(s) and

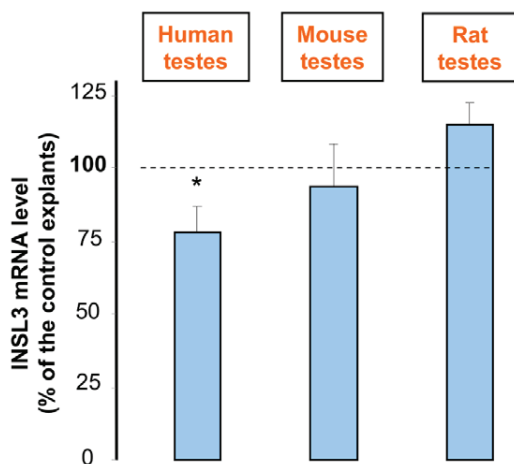


Figure 5. Effect of 10^{-8} M BPA on *INSL3* mRNA level in human, mouse and rat fetal testes. Testes were removed from human fetuses at 6.5 to 10.5 weeks of gestation or from mouse and rat fetuses at 12.5 and 14.5 dpc, respectively. For each fetus, both testes were cultured in control medium for 24 h (D0) and then one in the presence of 10^{-8} M BPA and the other one without for another 24 h. At the end of the culture, RT-PCR amplification was performed. Values are the mean $\pm$ SEM of *INSL3* mRNA level normalized to β -Actin one, and expressed as percentage of control values from 7 (human), 5 (mouse) and 6 (rat) independent experiments. * $p < 0.05$ in the statistical comparison between BPA-treated and control testes using the paired Wilcoxon's non-parametric paired test. doi:10.1371/journal.pone.0051579.g005

BPA sulfate(s) but, unconjugated BPA, which is the only biologically active form [49], has been detected in the majority of individuals in many developed countries with large inter-individual variations. No data on the concentration of BPA found in the plasma of human fetus during the first trimester are presently available. Vandenberg et al. recently reviewed the data

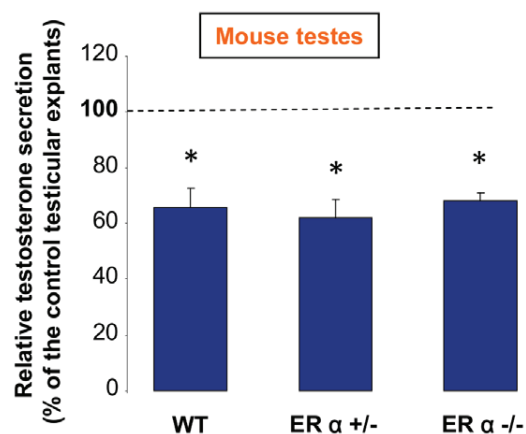


Figure 7. Effect of ERα gene inactivation on *in vitro* testicular response to BPA. Testes from homozygous 12.5 dpc (ERα^{−/−}), heterozygous (ERα^{+/-}) and wild-type (ERα^{+/+}) ERα-deficient fetuses were cultured on floating filters for 48 h. One testis from each animal was cultured in control medium and the other one in medium containing 10^{-5} M BPA. Values are means $\pm$ SEM of testosterone secreted in the medium during the 2 days of culture by BPA-treated testes referred to testosterone secreted by the respective contralateral control testes; $n = 6$ (ERα^{+/+}), 13 (ERα^{+/-}) and 5 (ERα^{−/−}), * $p < 0.05$ in the statistical comparison between BPA-treated and control testes using the Wilcoxon's parametric paired t test. doi:10.1371/journal.pone.0051579.g007

from 17 studies published between 2000 and 2009 dealing with the concentration of unconjugated BPA in blood and serum samples from healthy male and non-pregnant female adults. This review indicates that internal exposure to unconjugated BPA is in the range of 2 to 40.10⁻⁹ M with most studies suggesting an average internal exposure of approximately 4 to 13.10⁻⁹ M (1 to 3 ng/mL) [50]. BPA concentration in the blood or serum from pregnant women may be slightly higher since different studies reported a mean value of 17.10⁻⁹ M (3.88 ng/mL) [50]. However, in

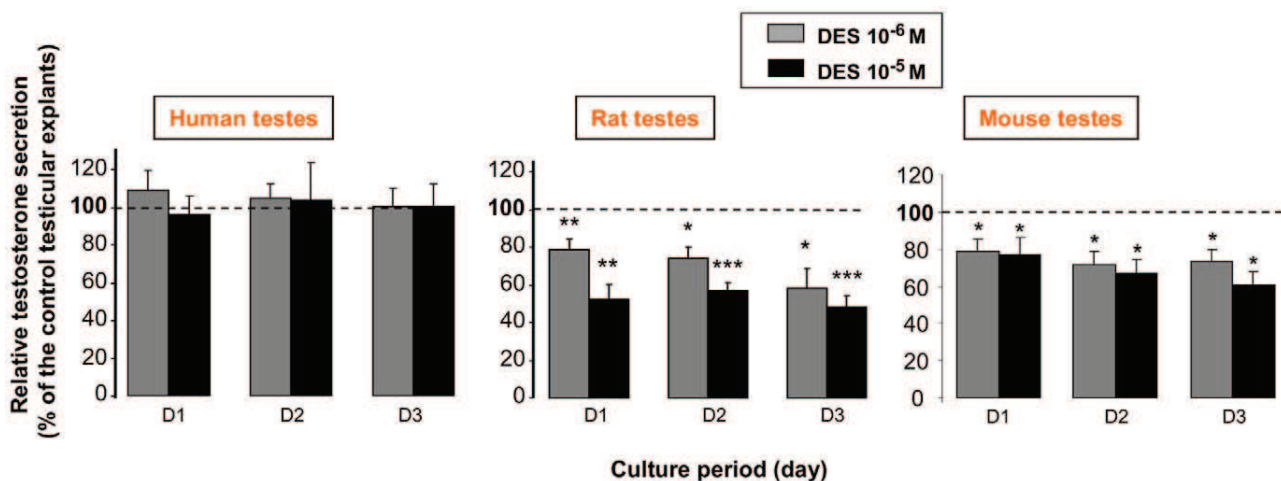


Figure 6. Effect of DES on testosterone secretion by human, rat and mouse fetal testes. Testes were removed from human fetuses at 6.5 to 10.5 weeks of gestation or from mouse and rat fetuses at 12.5 and 14.5 dpc, respectively. Like for the experiments presented in Figures 1 to 3, human rat and mouse testis explants were cultured in control medium (D0) for 24 h and then in the absence or presence of DES at 10^{-6} M or 10^{-5} M for the three subsequent days (D1–D3). Testosterone secretion in both treated and untreated samples at D1 to D3 was normalized to the D0 secretion of the same sample. The figure presents mean $\pm$ SEM of the D1 to D3 normalized values of treated samples expressed as the percentage of the control (untreated samples) values; $n = 6$, $n = 7$ –10 and $n = 7$ for human, rat and mouse testes respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in the statistical comparison between DES-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test. doi:10.1371/journal.pone.0051579.g006

another study, using isotopically labeled BPA, Teeguarden et al. showed that free BPA represents between 0.2 and 1.2% and no more than 2% of the total BPA in blood, leading to a concentration of free BPA in the plasma lower than 10^{-10} M [51]. Thus, the value of the BPA level of exposure is unclear. Nonetheless, BPA quantification in amniotic fluid and in umbilical cord (to estimate the internal exposure of the fetus) reported a mean level around 1 ng/ml (i.e. $4.3 \cdot 10^{-9}$ M) (reviewed in [26]). In a recent study, the concentration of unconjugated BPA was measured in 106 samples of umbilical cord blood in control newborn and concentrations ranged from 0.14 to 4.76 ng/ml (i.e. 0.6 to $20.8 \cdot 10^{-9}$ M) with a mean value equal to 1.12 ng/ml (i.e. $4.9 \cdot 10^{-9}$ M) [26]. Furthermore, it has been proposed that BPA might accumulate particularly in early fetuses because of lower metabolic clearance or conjugation at this development stage [52]. Taken together, our observation that a concentration of BPA as low as 10^{-8} M (2.28 ng/mL), is able to decrease testosterone secretion and mRNA levels of *INS3* in human fetal testis can be related to many, but not all reports concerning the internal exposure. Because there is still great uncertainty, and dispute, about the level of effective exposure in humans, it is presently not possible to conclude whether the present findings are health-relevant or not. This will only be resolved once more accurate data for internal human exposure, including the fetus at the first trimester of pregnancy, are established.

The potential dangers for human health of BPA at doses that are below the regulatory references are currently a matter of debates within the industry, the Agencies for Public Health and the scientific community [17,53]. However, so far, no experimental studies have evaluated the effect of low concentrations of BPA that might correspond to common environmental exposure on the endocrine activities of fetal testis in human and animals, although fetal testis is one of the major target of EDs [6,7,54].

Moreover, data dealing with the effect of BPA on the function of human adult Leydig cells are contradictory. Several epidemiological studies reported no changes in testosterone production in adults exposed to BPA, although weak inverse correlations of the testosterone/LH ratio and of estradiol/testosterone ratio with BPA levels were observed [55–57]. Conversely, others described a positive association between BPA and plasma testosterone concentrations [58]. Lastly, *in vitro* studies suggested that BPA could decrease steroidogenesis in a human adenocarcinoma cell line or in human microsomal preparations of human testes only at concentrations starting from $1.3 \cdot 10^{-7}$ M or 10^{-5} M [45,59].

II Comparison with Rat and Mouse

Using the same experimental approach, the same consumables and experimental materials, we also analyzed the effect of the same range of BPA concentrations on the function of Leydig cells in testes from rat and mouse fetuses. Furthermore, the studies of the three species were performed at a comparable developmental stage (i.e. the onset of steroidogenesis). No effects of the lowest tested doses (10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-12} M) were observed as BPA reduced the *in vitro* testosterone secretion only at concentrations equal 10^{-5} M. Similarly, 10^{-8} M BPA did not affect *Ins3* mRNA levels in rat and mouse fetal testes, differently from what we observed in human testes.

These species-specific differences are very important because animal models are routinely used in toxicological tests for the assessment of the BPA risk. Concerns about data extrapolation from *in vivo* animal studies to human risk assessment have already been raised, because BPA metabolism and pharmacokinetics may be different in rodents and in humans [53,60,61]. The present study reinforces these concerns by reporting interspecies differ-

ences in the responsiveness to BPA and clearly indicates that rodents are not relevant models for predicting the effect of low BPA concentrations on the endocrine function of human fetal testis. This is in agreement with our previous findings showing the human testes are more sensitive to cadmium exposure than rodent testes [40], while MEHP modifies testosterone production in mouse and rat, but not in human fetal testes [36–38]. These results highlight the need of rigorous comparisons of the effects in human and rodent models together, when assessing ED risk.

It is difficult to compare the sensitivity to BPA in rodent fetal-type (this study) and in adult-type Leydig cells because most of the investigations in adult animals were performed *in vivo* and BPA can affect the hypothalamo-pituitary-testicular axis at different levels [62]. Cultured adult rat Leydig cells were used only in two studies, but their results are confusing since one work reported that 1 to $1000 \cdot 10^{-9}$ M BPA had not effect on the production of testosterone [63], whereas the other observed a negative effect of BPA only at 10^{-11} M, but not at higher doses (10^{-10} to 10^{-6} M) [64].

III Mechanisms of Action

We observed here that 10^{-6} M and 10^{-5} M DES reduced fetal testicular steroidogenesis in rat and mouse fetal testes confirming our previous data [34,35,48]. On the contrary, using the same *in vitro* system, DES had no effect on testosterone produced by fetal human testes. This probably results from the fact that ER α expression (mRNA and protein) is not detected in human fetal testes [65] while DES acts on testicular steroidogenesis via ER α as shown by the disappearance of DES effect after ER α invalidation [48].

BPA binds to nuclear Estrogen Receptors (ER α and ER β), but its affinity for these receptors is weak [66]. This low affinity and the non-detectable expression of ER α in the human fetal testis suggest that ER α is not involved in the effect of BPA in human species. This is probably the same for mouse species since we observed here that the negative effect of BPA on mouse testicular steroidogenesis is maintained after invalidation of ER α .

Therefore, BPA should act via a signaling way different from ER α signaling and this pathway should be more efficient in human than in mouse and rat. Low concentrations of BPA have been reported to trigger effects via G-protein coupled receptor 30 (GPR 30, the membrane estrogen receptor) or Estrogen-related receptor gamma (ERR-gamma) [17,67,68]. Both GPR30 and ERR-gamma are expressed in the mouse and human fetal testis (personal observation). Interestingly, ERR-gamma has higher affinity for BPA than for DES [69]. The mechanism of action of BPA may be complex and it has been suggested that BPA might antagonize the binding of an unknown ligand of ERR-gamma that would be constitutively active [69]. More experiments must be conducted to identify the mechanism of action of BPA and the present study gives important methodological bases for conducting these experiments.

Conclusion

We show here for the first time that concentrations of BPA as low as 10^{-8} M are sufficient to reduce fetal testis endocrine activity in humans. The mechanism of action of BPA will need further investigation, but it is likely to involve non-classical estrogen receptors.

The negative effect of BPA on testosterone production and *Ins3* expression during fetal life observed here during the “masculinization programming window”, may have several consequences as it can impair the masculinization of internal and external genitalia [4,7,13]. Our present results should encourage prospective epidemiological studies to investigate the possible

association between environmental exposure to BPA during pregnancy and anogenital distance at birth. Furthermore, BPA-induced reduction of fetal testosterone production may have long-term consequences. Although brain masculinization and the onset of male-specific sexual behaviors start during the second half of pregnancy, we can't exclude that BPA-induced reduction of fetal testosterone production during the first trimester of pregnancy may influence these parameters [70]. It may also affect the germ cell lineage since androgens control gonocyte development [71]. Thus, it will be relevant to study the effect of BPA on gonocytes since alterations of the germ cell lineage may result in testicular cancer or in reduced sperm production [3,4] and may also explain the recently reported multigenerational effects of BPA [72].

Finally, our findings challenge the widespread use of rodent models to assess the toxic effects of EDs and highlight the need for setting up specific tools to study reprotoxicity in humans.

References

- Leridon H, Slama R (2008) The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Hum Reprod* 23: 1312–1319.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, et al. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4: 741–803.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 89: e33–38.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16: 972–978.
- Gaspari L, Paris F, Jandel C, Kalfa N, Orsini M, et al. (2011) Prenatal environmental risk factors for genital malformations in a population of 1442 French male newborns: a nested case-control study. *Hum Reprod* 26: 3155–3162.
- Habert R, Muczynski V, Leiraiki A, Lambrot R, Lecureuil C, et al. (2009) Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates. *Folia Histochem Cytobiol* 47: S67–74.
- Scott HM, Mason JI, Sharpe RM (2009) Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 30: 883–925.
- Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE (2010) Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 910–919.
- Bay K, Main KM, Toppari J, Skakkebaek NE, Medscape (2011) Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. *Nat Rev Urol* 8: 187–196.
- Ivell R, Anand-Ivell R (2009) Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Hum Reprod Update* 15: 463–476.
- van den Driesche S, Scott HM, MacLeod DJ, Fiskin M, Walker M, et al. (2011) Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. *Int J Androl* 34: e578–586.
- Welsh M, Saunders PT, Fiskin M, Scott HM, Hutchison GR, et al. (2008) Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 118: 1479–1490.
- Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE, Toppari J (2010) Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 279–289.
- Soto AM, Sonnenschein C (2010) Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol* 6: 363–370.
- Talsness CE, Andrade AJ, Kuriyama SN, Taylor JA, vom Saal FS (2009) Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2079–2096.
- Tyl RW (2009) Basic exploratory research versus guideline-compliant studies used for hazard evaluation and risk assessment: bisphenol A as a case study. *Environ Health Perspect* 117: 1644–1651.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM (2009) Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30: 75–95.
- Vandenberg LN, Hauser M, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24: 139–177.
- Tanaka M, Nakaya S, Katayama M, Leffers H, Nozawa S, et al. (2006) Effect of prenatal exposure to bisphenol A on the serum testosterone concentration of rats at birth. *Hum Exp Toxicol* 25: 369–373.
- Thuillier R, Manku G, Wang Y, Culty M (2009) Changes in MAPK pathway in neonatal and adult testis following fetal estrogen exposure and effects on rat testicular cells. *Microsc Res Tech* 72: 773–786.

Acknowledgments

We are grateful to Vincent Muczynski for help with human gonad collection, to Marie-Justine Guerquin for critical reading of the manuscript and to Marion Decorde and Romain Lambrot for their preliminary studies.

We thank the staff of the Department of Obstetrics and Gynecology of the Antoine Bécélère Hospital (Clamart, France). We also thank Véronique Neuville for animal care, Aurélie Gouret for secretarial assistance and E. Andermarcher for editing the English manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RH VRF. Performed the experiments: TNTB DM ML CL LL SMP. Analyzed the data: RH GL VRF. Contributed reagents/materials/analysis tools: SPG RF AB. Wrote the paper: RH TNTB.

- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23: 383–390.
- Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Ryan BC, et al. (2008) Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci* 102: 371–382.
- Kobayashi K, Miyagawa M, Wang RS, Sekiguchi S, Suda M, et al. (2002) Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring. *Ind Health* 40: 375–381.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, et al. (2002) Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 68: 121–146.
- Miao M, Yuan W, He Y, Zhou Z, Wang J, et al. (2011) In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91: 867–872.
- Feinichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, et al. (2012) Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 27: 983–990.
- Habert R, Devif I, Gangnerau MN, Lecerf L (1991) Ontogenesis of the in vitro response of rat testis to gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol* 82: 199–206.
- Lecerf L, Rouiller-Fabre V, Levacher C, Gautier C, Saez JM, et al. (1993) Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretions by the fetal rat testis in vitro. *Endocrinology* 133: 2313–2318.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P, Habert R (2000) Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod* 62: 1303–1314.
- Olaso R, Pairault C, Boulogne B, Durand P, Habert R (1998) Transforming growth factor beta1 and beta2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology* 139: 733–740.
- Livera G, Delbes G, Pairault C, Rouiller-Fabre V, Habert R (2006) Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 324: 507–521.
- Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, Donnadiu AC, Frydman R, et al. (2006) Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2696–2703.
- Lambrot R, Livera G, Coffigny H, Pairault C, Frydman R, et al. (2006) A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 88: 1831–1835.
- Delbes G, Duquenne C, Szenker J, Taccon J, Habert R, et al. (2007) Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life. *Toxicol Sci* 99: 234–243.
- Lassurquere J, Livera G, Habert R, Jegou B (2003) Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci* 73: 160–169.
- Chauvigne F, Menuet A, Lesne L, Chagnon MC, Chevrier C, et al. (2009) Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117: 515–521.
- Lambrot R, Muczynski V, Lecureuil C, Angenard G, Coffigny H, et al. (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117: 32–37.
- Leiraiki A, Racine C, Krust A, Habert R, Levacher C (2009) Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 111: 372–382.
- Muczynski V, Cravedi JP, Leiraiki A, Levacher C, Moison D, et al. (2012) Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: In vitro and in vivo approaches. *Toxicol Appl Pharmacol* 261: 97–104.

40. Angenard G, Muczynski V, Coffigny H, Pairault C, Duquenne C, et al. (2010) Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. *Environ Health Perspect* 118: 331–337.
41. Kristensen DM, Hass U, Lesne L, Lottrup G, Jacobsen PR, et al. (2010) Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum Reprod* 26: 235–244.
42. Lehraiki A, Chamaillard C, Krust A, Habert R, Levacher C (2011) Genistein impairs early testosterone production in fetal mouse testis via estrogen receptor alpha. *Toxicol In Vitro* 25: 1542–1547.
43. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, et al. (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277–4291.
44. Evtouchenko L, Studer L, Spenger C, Dreher E, Seiler RW (1996) A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. *Cell Transplant* 5: 453–464.
45. Zhang X, Chang H, Wiseman S, He Y, Higley E, et al. (2011) Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells. *Toxicol Sci* 121: 320–327.
46. Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, et al. (2011) Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85: 2053–2059.
47. Habert R, Picon R (1984) Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem* 21: 193–198.
48. Delbes G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P, et al. (2005) Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 146: 2454–2461.
49. Lacroix MZ, Puel S, Collet SH, Corbel T, Picard-Hagen N, et al. (2011) Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85: 2053–2059.
50. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, et al. (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118: 1055–1070.
51. Teeguarden JG, Calafat AM, Ye X, Doerge DR, Churchwell MI, et al. (2011) Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol A during high-dietary exposure. *Toxicol Sci* 123: 48–57.
52. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y (2002) Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17: 2839–2841.
53. Vom Saal FS, Prins GS, Welshons WV (2011) Report of Very Low Real World Exposure to Bisphenol A is Unwarranted Based on a Lack of Data and Flawed Assumptions. *Toxicol Sci*.
54. Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, et al. (2010) Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 119: 547–552.
55. Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S (2002) Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* 59: 625–628.
56. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R (2010) Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol* 44: 1458–1463.
57. Mendiola J, Jorgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, et al. (2010) Are environmental levels of bisphenol A associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect* 118: 1286–1291.
58. Galloway T, Cipelli R, Guralnik J, Ferrucci L, Bandinelli S, et al. (2010) Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect* 118: 1603–1608.
59. Ye L, Zhao B, Hu G, Chu Y, Ge RS (2011) Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol Lett* 207: 137–142.
60. Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK, Lipscomb JC (2010) Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos* 38: 2232–2238.
61. Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, Drury B, Rottinghaus G, et al. (2011) Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect* 119: 422–430.
62. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, et al. (2010) Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett* 194: 16–25.
63. Muroto EP, Derk RC, de Leon JH (2001) Differential effects of octylphenol, 17beta-estradiol, endosulfan, or bisphenol A on the steroidogenic competence of cultured adult rat Leydig cells. *Reprod Toxicol* 15: 551–560.
64. Akingbemi BT, Sottas CM, Koulouva AI, Klinefelter GR, Hardy MP (2004) 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.
65. Gaskell TL, Robinson LL, Groome NP, Anderson RA, Saunders PT (2003) Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 424–432.
66. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252–4263.
67. Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P (2009) Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 117: 1053–1058.
68. Chevalier N, Vega A, Bouskine A, Siddeek B, Michiels JF, et al. (2012) GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is over-expressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. *PLoS One* 7: e34672.
69. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, et al. (2006) Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 167: 95–105.
70. Swaab DF (2007) Sexual differentiation of the brain and behavior. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21: 431–444.
71. Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG, Habert R (2007) Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3615–3620.
72. Salian S, Doshi T, Vanage G (2011) Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring—an overview. *Reprod Toxicol* 31: 359–362.

Résultats non publiés

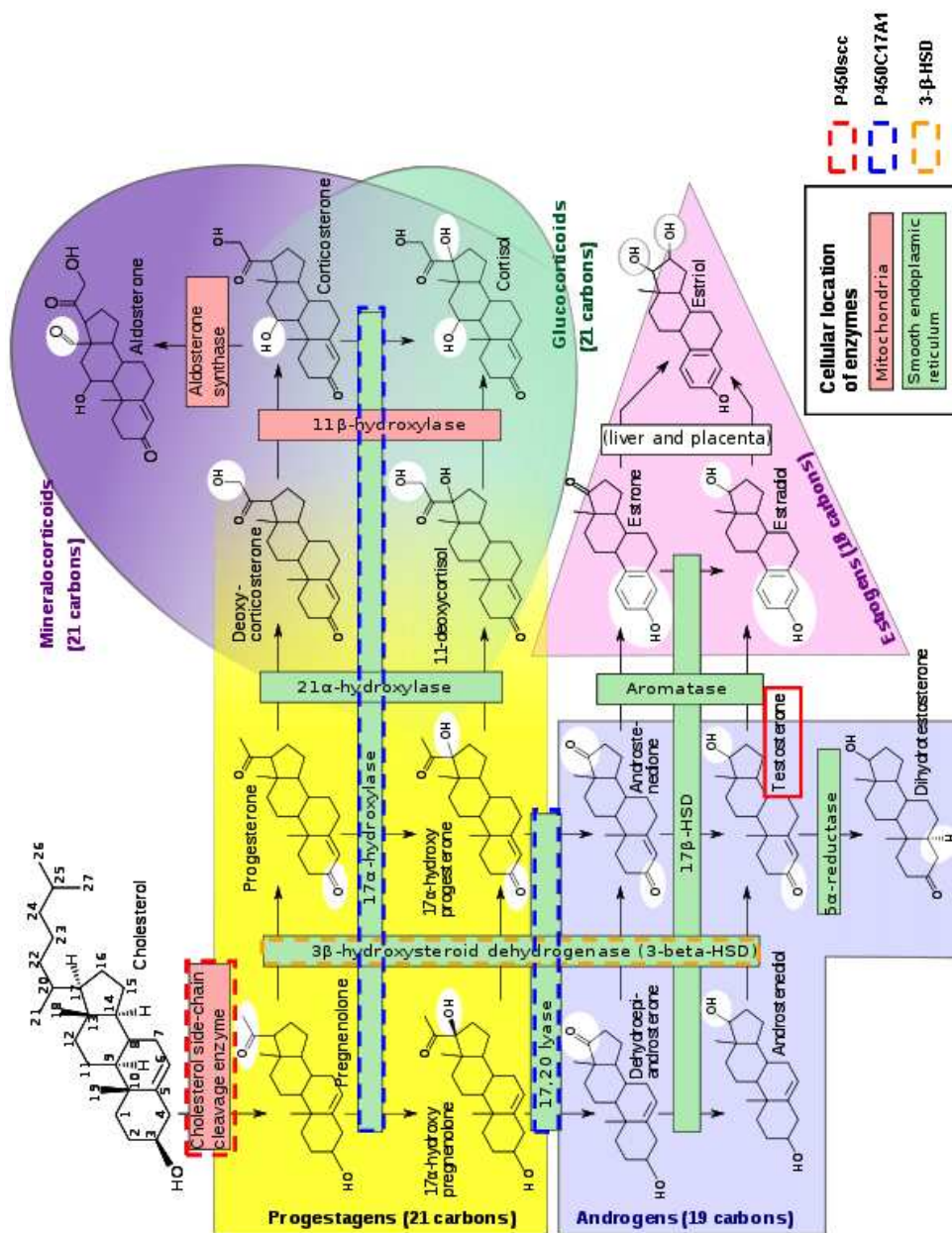


Figure 1 : Stéroïdogénèse

Schéma de synthèse des différentes hormones formées à partir du cholestérol dans les cellules et tissus stéroïdogènes

I. Effets du BPA sur l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse

I.A. Introduction

Dans le testicule, la synthèse de testostérone est effectuée par les cellules de Leydig, à la suite d'une succession de réactions enzymatiques ayant pour substrat d'origine le cholestérol. La première étape limitant la production de testostérone est le transport du cholestérol dans les mitochondries par la protéine StAR (steroid acute regulatory protein). La réaction suivante est catalysée par l'enzyme P450scc (cytochrome P450 side chain cleavage), qui va cliver le cholestérol afin de former la pregnenolone. Par la suite, la pregnenolone est transformée par Cyp17a1 (cytochrome P450 17A1) et la 3- β -HSD (3- β -hydroxy-steroid-desyhydrogenase) en une série d'hormones dont la transformation aboutit à la synthèse de testostérone. Ces enzymes sont présentes et fonctionnelles dès la vie fœtale puisque les cellules de Leydig fœtales produisent de la testostérone très tôt au cours du développement et la testostérone produite est indispensable à la masculinisation du fœtus (cf. *Introduction, Paragraphe I.C.2*).

Chez l'adulte, le BPA est décrit dans différentes études comme capable d'altérer la stéroïdogénèse (Nakamura et al., 2010, Salian et al., 2009b, Tanaka et al., 2006). Chez le rat, un traitement au BPA en période pré-pubertaire induit une diminution de la production de testostérone et également de l'expression des gènes *StAR*, *P450scc* et *P450C17a1* (Nakamura et al., 2010). De même, il a déjà été démontré que le BPA est capable de modifier l'expression de certains gènes de la stéroïdogénèse ovarienne, dans des cultures de follicules antraux (Peretz et al., 2011) ou de cellules de la granulosa (Zhou et al., 2008b).

Pour tenter d'expliquer les effets délétères du BPA sur la production de testostérone par le testicule fœtal observé dans notre travail (cf. article 1), nous avons mesuré, à la fois chez l'Homme et chez la souris, le niveau d'expression des gènes codant pour les principales protéines intervenant dans la stéroïdogénèse : StAR, P450scc, P450C17a1 et la 3- β -HSD.

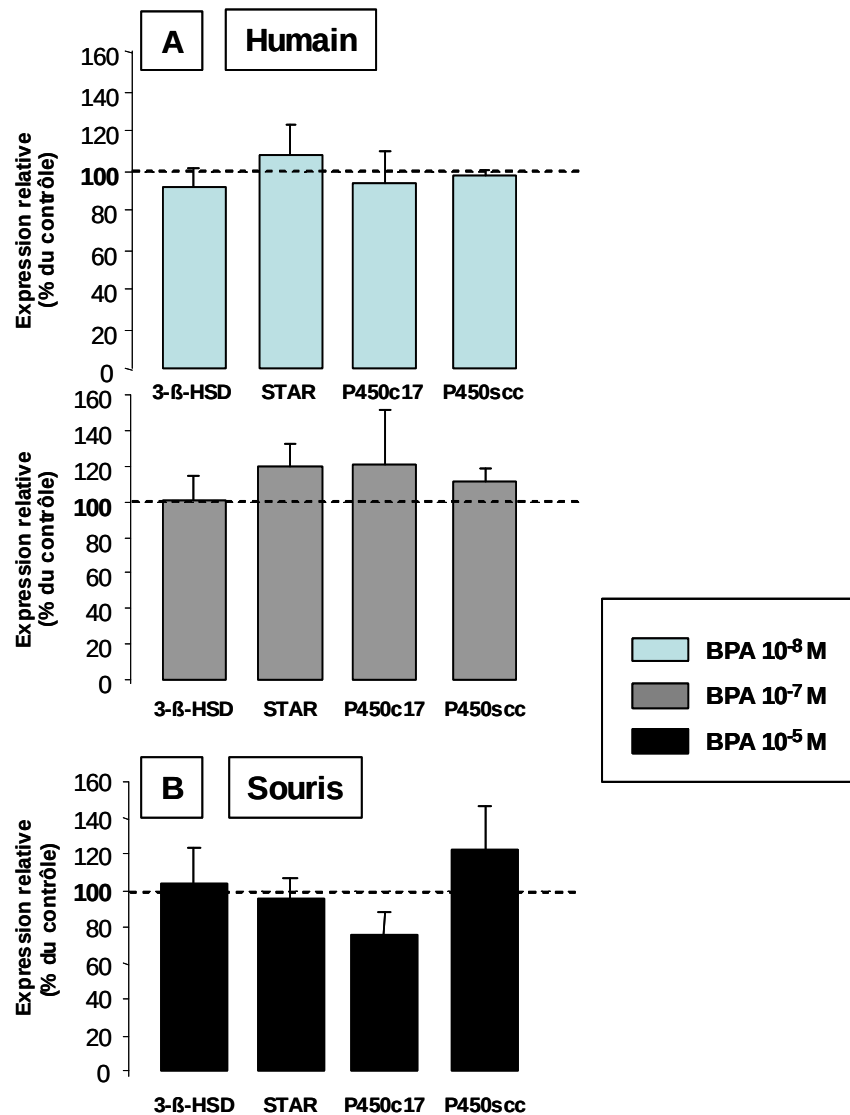


Figure 2: Effet du BPA sur l'expression de StAR et de gènes des enzymes de la stéroïdogénèse dans les testicules fœtaux humains et murins.

Les testicules fœtaux proviennent de fœtus humains âgés de 6,5 à 10,5 SG ou de fœtus de souris à 12,5 jpc. (A) Pour chaque fœtus humain, un testicule est cultivé en présence de 10⁻⁸ M ou 10⁻⁷ M de BPA et l'autre en condition contrôle, pendant 72 h. (B) Pour chaque fœtus de souris, un testicule est cultivé en présence de 10⁻⁵ M de BPA et l'autre en condition contrôle, pendant 48 h. A la fin de la culture, une RT-qPCR est effectuée. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de l'expression des gènes StAR, 3-β-HSD, P450C17 et P450scc normalisée à la β-Actine, et exprimée en pourcentage du contrôle, sur 4 (humain) et 5 (souris) échantillons indépendants.

I.B. Matériel et Méthodes

(cf. Chapitre « *Matériel et Méthodes* » du manuscrit)

I.C. Résultats

Nous avons étudié les effets du BPA sur le niveau d'expression des gènes des principales protéines impliquées dans la synthèse de testostérone. Quelque soit la concentration de BPA utilisée (10^{-7} M ou 10^{-8} M chez l'Homme et 10^{-5} M chez la souris), le niveau d'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (*StAR*, *3- β -HSD*, *P450C17* et *P450scc*) n'est pas modifié de façon significative par le traitement au BPA.

I.D. Discussion

Nous avons focalisé notre étude sur les concentrations de BPA les plus faibles induisant un effet sur la sécrétion de testostérone. Une altération de l'expression des principales enzymes impliquées dans la synthèse de testostérone pourrait expliquer une diminution de la production de cette hormone. Cependant, dans notre modèle de culture organotypique, nous n'observons aucun effet du BPA sur l'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse que ce soit chez l'Homme ou chez la souris. Dans une étude réalisée *in vitro* sur le testicule du poisson Tilapia du Nil, il est également démontré que le BPA, à une concentration d'environ 4.10^{-8} M (10 μ g/L), ne modifie pas le niveau d'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse (Ribeiro et al., 2012). De même, chez le rat, après une exposition prénatale au BPA et une observation à 16 jpp, l'expression de *StAR* n'est modifiée ni au niveau des transcrits, ni au niveau protéique (Horstman et al., 2012). Dans notre modèle, une étude doit être effectuée après des temps de traitement plus courts. En effet, nous avons réalisé notre étude après 72h de traitement chez l'Homme et 48h chez la souris, or des modifications transcriptionnelles peuvent intervenir très rapidement dans le testicule. Par ailleurs, la diminution de production de testostérone est observable dès le premier jour de culture. De façon générale, les PEs peuvent agir à de multiples niveaux. Le BPA peut bien sûr modifier la synthèse de la testostérone mais également son transport et modifier ainsi les concentrations hormonales. D'autre part, la diminution de la production de testostérone peut résulter d'une augmentation de son métabolisme. Ainsi, il semble

indispensable de vérifier les effets du BPA sur l'expression de l'aromatase, enzyme qui transforme les androgènes en œstrogènes. Chez la souris, une exposition périnatale au BPA entraîne une augmentation de l'expression de l'aromatase dans le testicule (Xi et al., 2011). De plus, l'expression de la 5 α -réductase, enzyme qui convertit la testostérone en DHT (dihydrotestostérone) devra être étudiée. Le BPA est décrit comme un agent mitogène augmentant le nombre de cellules de Leydig à la fois *in vitro* et *in vivo* (Nanjappa et al., 2012). Bien que l'effet observé sur la production de testostérone soit inhibiteur, il serait également important de vérifier l'impact du BPA sur le nombre de cellules de Leydig. Enfin, d'autres pistes doivent être recherchées. Il sera important d'étudier le niveau d'expression protéique des enzymes de la stéroïdogénèse en présence de BPA, et surtout leur activité enzymatique. Il a été démontré que le BPA peut diminuer l'activité enzymatique de la 3- β -HSD et de P450C17 chez l'Homme et chez le rat (Ye et al., 2011). Cette étude s'affranchit d'ailleurs d'effets potentiels du BPA via des récepteurs cellulaires, étant donné que l'observation n'est pas réalisée au niveau cellulaire, mais directement sur les enzymes à partir de résidus de réticulum endoplasmique (Ye et al., 2011). Une démonstration *in vivo* d'une éventuelle diminution d'activité des enzymes responsables de la synthèse de la testostérone constituerait une grande avancée dans la compréhension du mécanisme d'action du BPA.

II. Etude de l'effet du BPA sur la gamétogenèse

II.A. Introduction

La gamétogenèse joue un rôle fondamental dans la fertilité de l'individu. En effet, la quantité de cellules germinales et de cellules de Sertoli mises en place pendant la vie fœtale détermine en partie la quantité de spermatozoïdes et la fertilité de l'individu adulte (Forand et al., 2009, Habert et al., 2009, Orth et al., 1988). Plusieurs perturbateurs endocriniens ont été décrits comme capables d'altérer la gamétogenèse. Dans notre laboratoire, les effets du MEHP sur la survie des cellules germinales ont déjà été démontrés, à la fois chez l'Homme et chez la souris (Lambrot et al., 2009, Lehraiki et al., 2009, Muczynski et al., 2012a). Des effets du BPA sur la survie des cellules germinales en période fœtale n'ont pas été décrits jusqu'à présent. En revanche, chez le rat, une exposition au BPA de 12 jpc à 21 jpp provoque une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes à l'âge adulte (Salian et al., 2009b). Chez la souris, le BPA administré par implants (5 mg) en période de gestation et de lactation induit une diminution du nombre de spermatides matures dans les tubes séminifères (Okada and Kai, 2008). De plus, plusieurs études démontrent des effets transgénérationnels du BPA, ce qui suggère l'apparition de modifications épigénétiques dans les cellules germinales, transmises à la descendance (Salian et al., 2009b, Wolstenholme et al., 2012). Les cellules germinales peuvent être atteintes directement par les PEs, mais aussi indirectement, via les cellules somatiques. En effet, une altération des cellules de Sertoli, cellules de soutien et cellules « nourricières » des cellules germinales peut entraîner des défauts de développement importants au niveau des cellules germinales. Une détérioration des protéines des jonctions cellulaires, comme décrite par Salian et al. dans le testicule de rat, pourrait entraîner des défauts de formation des cordons séminifères (Salian et al., 2009a). De même, les cellules germinales fœtales sont également dépendantes de la production d'androgènes par les cellules de Leydig (Merlet et al., 2007). L'ensemble de ces données ainsi que le phénotype observé sur la sécrétion de testostérone nous ont conduit à

étudier l'apoptose et la prolifération des cellules germinales afin de déterminer si le BPA pouvait affecter directement ou indirectement leur survie.

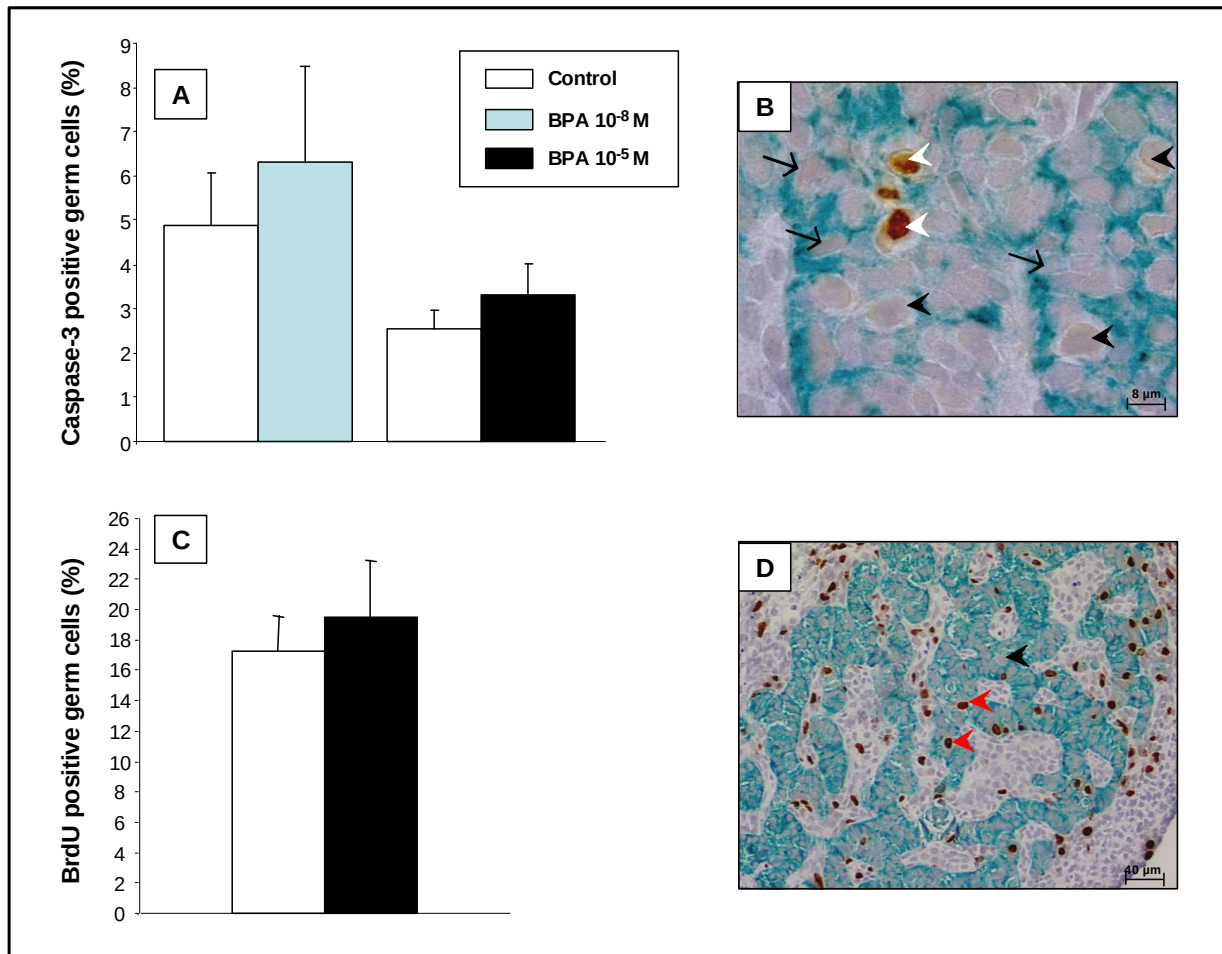


Figure 3: Effet du BPA sur l'apoptose et la prolifération des cellules germinales dans les testicules fœtaux humains.

Les testicules fœtaux proviennent de fœtus humains âgés de 6,5 à 10,5 SG. Pour chaque fœtus, un testicule est cultivé en présence de 10⁻⁸ M ou 10⁻⁵ M de BPA et l'autre en condition contrôle, pendant 72 h. A la fin de la culture, les gonades sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% ou du liquide de Bouin puis un double marquage immunohistochimique est effectué avec les anticorps dirigés contre l'AMH (en vert) et contre la caspase-3 clivée (en marron (B)) pour le comptage des cellules germinales apoptotiques ou contre le BrdU (en marron (D)). (A-C) Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SEM de 5 expériences. (B-D) Flèches noires: cellules de Sertoli; Pointes de flèche noires: gonocytes; Pointes de flèche blanches: gonocytes apoptotiques; Pointes de flèche rouges: gonocytes en prolifération.

II.B. Materiel et Méthodes

(cf. Chapitre « *Matériel et Méthodes* » du manuscrit)

II.C. Résultats

Nous avons étudié les effets du BPA sur le taux d'apoptose et de prolifération des cellules germinales dans le testicule fœtal humain et murin. Le taux d'apoptose des gonocytes ne semble pas modifié ni dans le testicule fœtal humain traité aux concentrations de 10^{-8} et 10^{-5} M (Fig. 3A). Bien que les valeurs ne soient pas significatives, une tendance à l'augmentation de l'apoptose est observée. Chez l'Homme, le test statistique donne une valeur de $p=0,08$, donc, une augmentation du nombre de cas nous permettra peut-être de voir un effet plus net. Chez la souris, nous observons également une tendance à l'augmentation à 10^{-5} M, et une augmentation significative à 10^{-7} M (Fig. 4A)

Le taux de prolifération des cellules germinales a également été étudié. Chez l'Homme, nous n'observons pas de modification du taux de prolifération des gonocytes, même à la forte dose de 10^{-5} M (Fig. 3C). En revanche, en réalisant la mesure après 24 h de culture chez la souris, nous observons une diminution significative du taux de prolifération dès la dose de 10^{-7} M de BPA (Fig 4B).

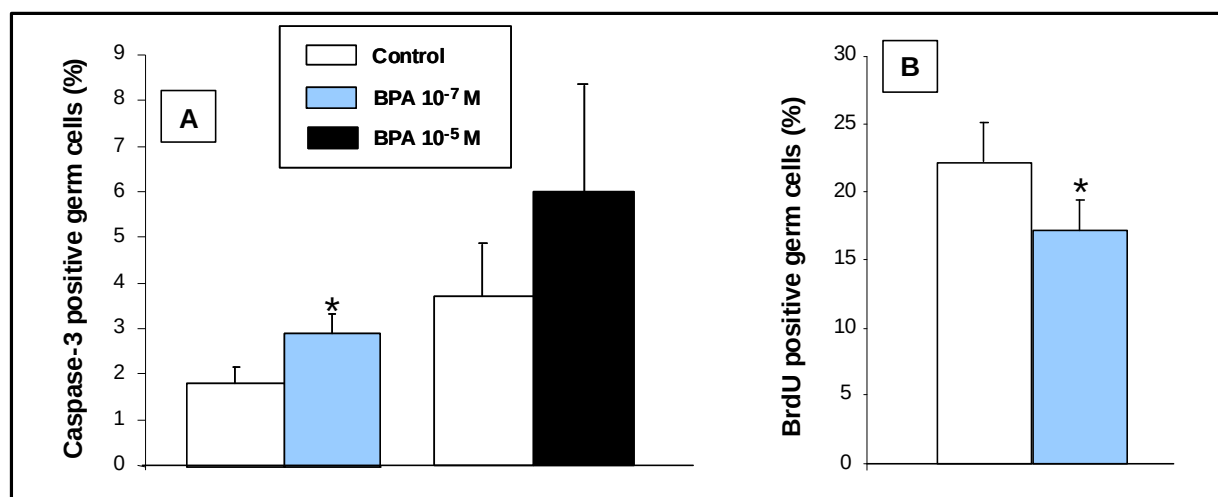


Figure 4: Effet du BPA sur l'apoptose et la prolifération des cellules germinales dans le testicule fœtal murin.

Les testicules fœtaux proviennent de fœtus de souris à 12,5 jpc. Pour chaque fœtus, un testicule est cultivé en présence de 10^{-7} ou 10^{-5} M de BPA et l'autre en condition contrôle, pendant 24h pour la

mesure de prolifération et pendant 48h pour la mesure du taux d'apoptose. A la fin de la culture, les gonades sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% ou du liquide de Bouin puis un double marquage immunohistochimique est effectué avec les anticorps dirigés contre l'AMH et contre la caspase-3 clivée ou le BrDU pour le comptage des cellules germinales apoptotiques ou en prolifération. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SEM de 5 expériences.

II.D. Discussion

Dans notre modèle de culture organotypique, les effets du BPA sur les testicules fœtaux humains et murins diffèrent. Chez l'Homme, le taux d'apoptose des cellules germinales n'est pas modifié par le traitement au BPA, malgré une légère tendance à l'augmentation à la forte dose de 10^{-5} M. Par ailleurs, nous avons également étudié le taux de prolifération des gonocytes après traitement au BPA à la concentration de 10^{-5} M, et aucune modification n'a été observée. En revanche, chez la souris, à la dose 10^{-7} M, nous avons pu mettre en évidence un effet du BPA sur l'apoptose des cellules germinales à 48h et sur leur prolifération à 24h. Ces résultats suggèrent que le nombre de spermatozoïdes pourrait être diminué à l'âge adulte, comme l'atteste l'étude de Salian et al. réalisée *in vivo* chez le rat après traitement au BPA *in utero* (Salian et al., 2009b). De nombreux perturbateurs endocriniens sont connus pour leurs effets délétères sur la lignée germinale. Ainsi le MEHP, qui appartient à la famille des plastifiants comme le BPA, augmente le taux d'apoptose des cellules germinales et réduit leur nombre, *in vitro*, chez le rat (Chauvigne et al., 2009), la souris (Lehraiki et al., 2009), et l'Homme (Lambrot et al., 2009, Muczynski et al., 2012a). De même, le DES, œstrogène de synthèse souvent utilisé comme contrôle positif réduit le nombre de cellules germinales en augmentant l'apoptose et en diminuant la prolifération (Lassurguere et al., 2003). Dans ces modèles *in vitro*, en ce qui concerne l'effet du MEHP sur la prolifération des cellules germinales, chez l'Homme, le MEHP ne modifie pas le taux d'incorporation de BrdU (Lambrot et al., 2009) alors que chez la souris, en fonction de l'âge des fœtus, l'effet peut être positif ou négatif (Lehraiki et al., 2009). La toxicité du BPA en période fœtale peut donc conduire à des altérations des cellules germinales, cependant, ces altérations sont la conséquence soit de la détérioration des fonctions des cellules somatiques qui permettent le bon développement des cellules germinales sur le long terme,

soit d'une atteinte directe des cellules germinales. En ce qui concerne les effets du BPA sur les cellules somatiques, des altérations des jonctions cellulaires entre les cellules de Sertoli, qui permettent le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-testiculaire ont été décrites. Chez le rat, les niveaux d'expression de plusieurs protéines des jonctions cellulaires (Cx43 (connexine 43), ZO-1 (zona occludin-1), N-cadhérine) sont modifiés par un traitement au BPA en période néonatale (Salian et al., 2009a). Une autre étude réalisée sur des cellules de Sertoli en culture met en évidence une désorganisation réversible de ces jonctions, induite par le BPA (Li et al., 2010b).

D'autres niveaux d'action du BPA sur les cellules germinales peuvent être envisagés. Pendant la vie fœtale, les cellules germinales subissent une série de modifications permettant leur différenciation (Olaso and Habert, 2000). Il serait pertinent d'étudier le niveau d'expression des gènes de pluripotence et de différenciation des cellules germinales après traitement au BPA. Chez la souris, les gonocytes connaissent des phases de prolifération, apoptose et quiescence de façon synchrone (Olaso and Habert, 2000). Un retard de différenciation pourrait induire des altérations de la qualité spermatique à l'âge adulte. Récemment, dans un modèle *in vitro* de différenciation de cellules souches embryonnaires (ES), il a été montré que le BPA module la différenciation des cellules germinales en up-régulant l'expression du gène *Stra8*, caractéristique de l'entrée en méiose (Aoki and Takada, 2012). De plus, les effets transgénérationnels observés après traitement au BPA suggèrent des modifications du niveau de méthylation des cellules germinales (Salian et al., 2009b). L'étude des taux d'expression des méthyltransférases et/ou l'étude directe des taux de méthylation dans les cellules germinales pourrait être une approche pertinente pour comprendre les effets du BPA. En effet, le niveau de méthylation de plusieurs gènes à empreinte tels que *Igfr2*, *Peg3* ou *H19* est diminué chez la souris, après traitement au BPA dès 0,5 jpc (Zhang et al., 2012).

Par ailleurs, des méthodes de tri cellulaire par cytométrie en flux ont été développées au laboratoire aussi bien chez la souris (Souquet et al., 2012) que chez l'Homme (Muczynski et

al., 2012b), ce qui permettrait de réaliser des recherches plus approfondies spécifiquement dans les cellules germinales, plutôt que sur le testicule entier.

III. Analyse transcriptomique

III.A. Introduction

Les effets délétères du BPA ont été décrits dans de nombreux organes et systèmes, notamment le cerveau, la thyroïde et bien sûr le système reproducteur. Il est reconnu comme perturbateur endocrinien oestrogéno-mimétique, de par sa capacité à se lier aux récepteurs classiques des œstrogènes, ER α et ER β . Des études démontrent qu'il est capable de lier d'autres récepteurs aux œstrogènes tels que GPR30 ou ERR γ , et aussi d'autres types de récepteurs tels que les AR ou PPAR- γ . Cependant, les mécanismes par lesquels il exerce ses effets délétères sont à ce jour peu connus. De nombreuses études descriptives ont été publiées, démontrant la capacité de liaison du BPA à certains récepteurs d'une part, et des phénotypes observés *in vitro* ou *in vivo* d'autre part. De plus en plus d'études décrivent des voies de signalisation activées par le BPA dans différents organes, notamment dans le testicule. Dans une lignée de séminome germinale, Chevalier et al., démontrent un effet prolifératif du BPA via le récepteur GPR30 (Chevalier et al., 2012). Un effet du BPA via GPR30 a par ailleurs été retrouvé dans la lignée de cellules de cancer du sein SKBR3, où le BPA augmente l'expression de plusieurs gènes cibles du récepteur via la voie de signalisation GPR30/EGFR/Erk (Pupo et al., 2012).

Nos résultats précédents démontrent que le bisphénol A possède un effet délétère sur la production de testostérone du testicule fœtal, chez le rat, la souris et chez l'Homme. Nous avons également observé une augmentation du taux d'apoptose des cellules germinales après traitement au BPA chez la souris et cette même tendance chez l'Homme. Pour tenter de comprendre les mécanismes d'action du BPA et de déterminer si les phénotypes observés sont les résultats de modifications au niveau transcriptionnel, nous avons effectué une première approche en nous intéressant aux gènes impliqués dans la stéroïdogénèse fœtale. Nous n'avons observé aucune modification du niveau d'expression des gènes des principales enzymes de la stéroïdogénèse, cependant, le niveau d'expression de toutes les protéines impliquées dans la production de testostérone n'a pas été mesuré.

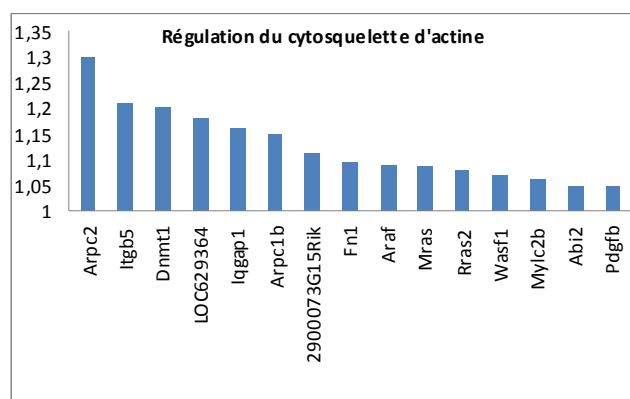
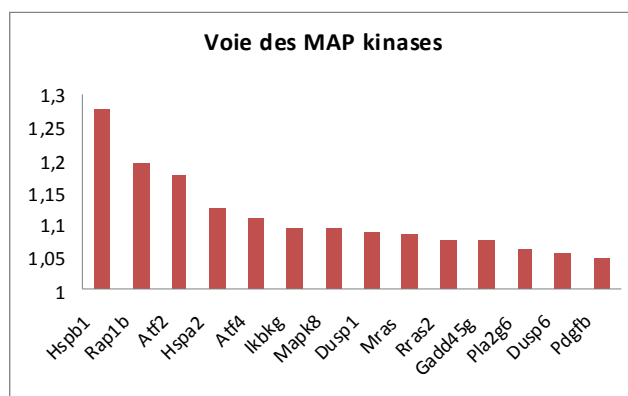
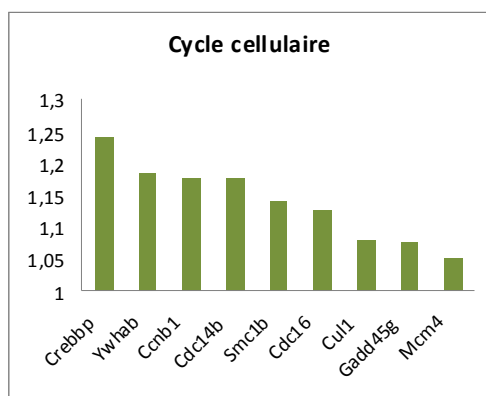
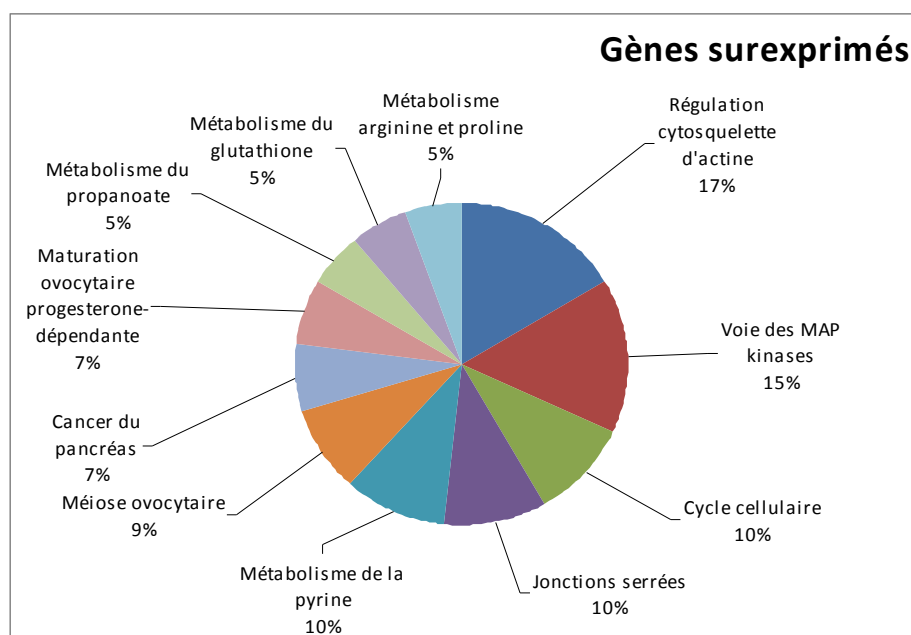


Figure 5 : Effet positif du BPA sur l'expression de gènes impliqués dans différents processus biologiques ou voies de signalisation.

Les gènes dont l'expression est augmentée par le BPA peuvent être regroupés dans différents groupes selon leurs rôles physiologiques. (D'après le logiciel DAVID Bioinformatics Resources 6.7)

L'aromatase, qui métabolise la testostérone en œstradiol, peut-être activée par le BPA (Kim et al., 2010) et devra être étudiée dans notre modèle. Le mécanisme d'action par lequel le BPA exerce son effet apoptotique sur les cellules germinales est également inconnu. Dans des testicules de souris adultes, le BPA augmente le taux d'apoptose testiculaire et augmente de façon significative l'expression de Fas et FasL (Li et al., 2009). Cependant, un phénotype apoptotique peut être du à la modulation d'un large spectre de voies de signalisation différentes.

Afin de réduire notre champ d'hypothèses et d'effectuer une analyse plus exhaustive des voies de signalisation par lesquelles le BPA exerce ses effets anti-androgéniques et apoptotiques dans notre modèle de culture de testicule fœtal, nous avons choisi d'étudier le niveau d'expression de l'ensemble du transcriptome via une étude transcriptomique réalisée sur le testicule fœtal de souris.

III.B. Matériel et Méthodes

(cf. Chapitre « *Matériel et Méthodes* » du manuscrit)

III.C. Résultats

Nous avons réalisé des cultures de testicule de souris de 12,5 jpc pendant 6 heures en présence ou en absence de BPA à la dose de 10^{-7} M. Nous avons choisi cette dose puisque c'est celle pour laquelle nous avons observé un effet pro-apoptotique du BPA. Le temps de traitement court a été choisi afin d'identifier les effets moléculaires à court terme. Notre étude transcriptomique porte sur un total de 46 000 séquences, correspondant à 35 000 gènes. Après 6 heures de traitement au BPA à la dose de 10^{-7} M, nous avons retrouvé un total de 1342 gènes dont l'expression a été significativement modifiée. 648 gènes sont régulés positivement avec une induction maximale de 35%. 694 gènes sont régulés négativement, avec un maximum de 26% de réduction du taux d'expression (Tableau 1).

	Nombre de gènes	Expression min.	Expression max..
Gènes surexprimés	648	1,05	1,35
Gènes réprimés	694	0,74	0,95

Tableau 1 : Nombre de gènes dont l'expression est modulée par le BPA

Les gènes dont l'expression est modulée par le traitement au BPA peuvent être regroupés en « familles » de gènes reliées soit à un processus biologique donné (par exemple, le métabolisme oxydatif) soit à une voie de signalisation particulière (par exemple, la voie Wnt). Pour effectuer un classement parmi ces 1342 gènes, nous avons utilisé l'outil de classement et les bases de données du logiciel DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (NIAD/NIH).

Les gènes surexprimés peuvent être divisés en 11 groupes, parmi lesquels 3 catégories se détachent. 9 gènes significativement surexprimés interviennent dans le cycle cellulaire, 14 gènes appartiennent à la voie des MAP kinases, 15 sont impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine.

Parmi les gènes réprimés, 14 catégories ont été identifiées. Celles regroupant le plus de gènes étant la voie de l'épissage alternatif et la voie Wnt, avec chacune 12 gènes significativement réprimés.

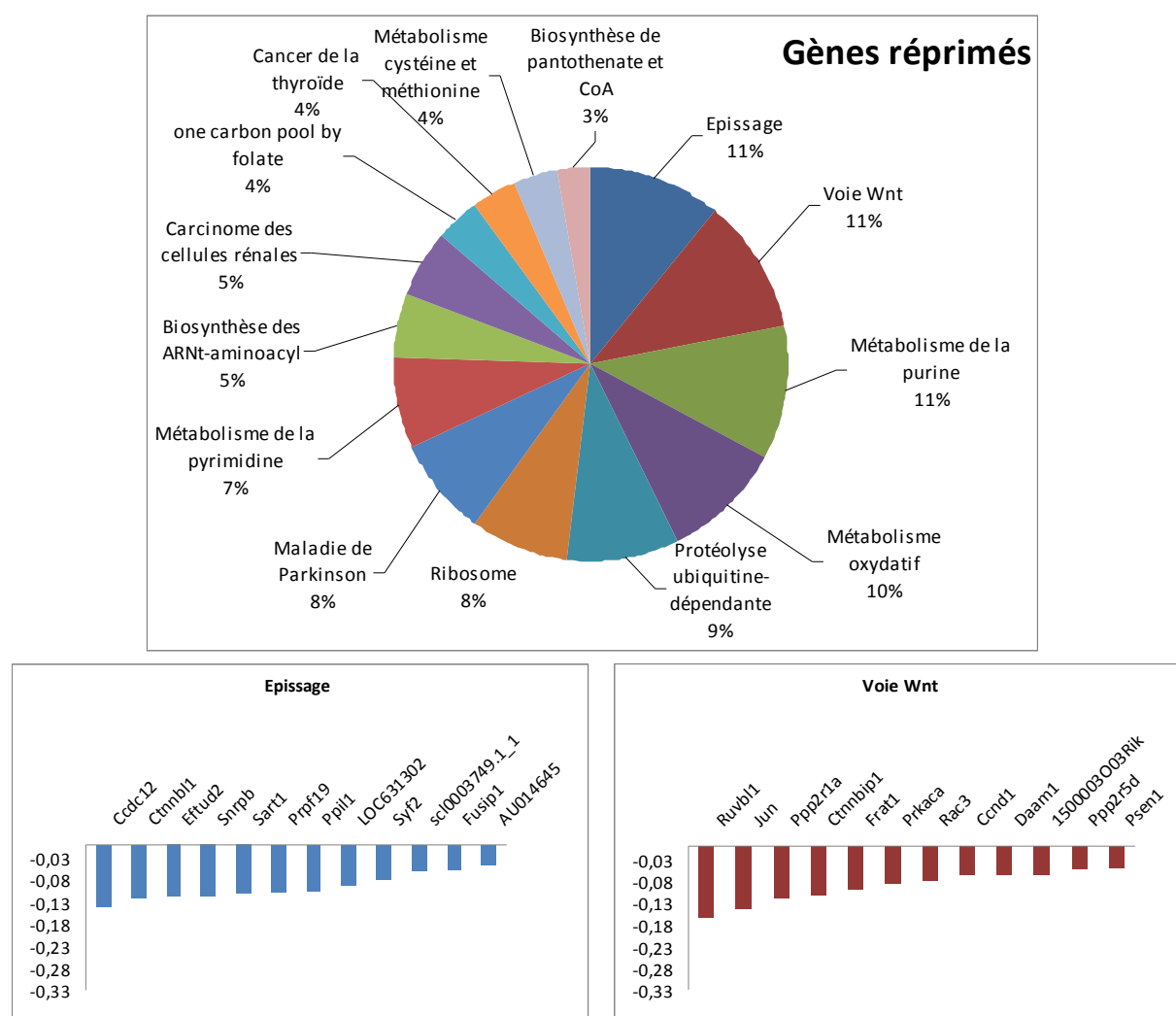


Figure 6 : Effet négatif du BPA sur l'expression de gènes impliqués dans différents processus biologiques ou voies de signalisation.

Les gènes dont l'expression est diminuée par le BPA peuvent être regroupés dans différents groupes selon leurs rôles physiologiques. (D'après le logiciel DAVID Bioinformatics Resources 6.7)

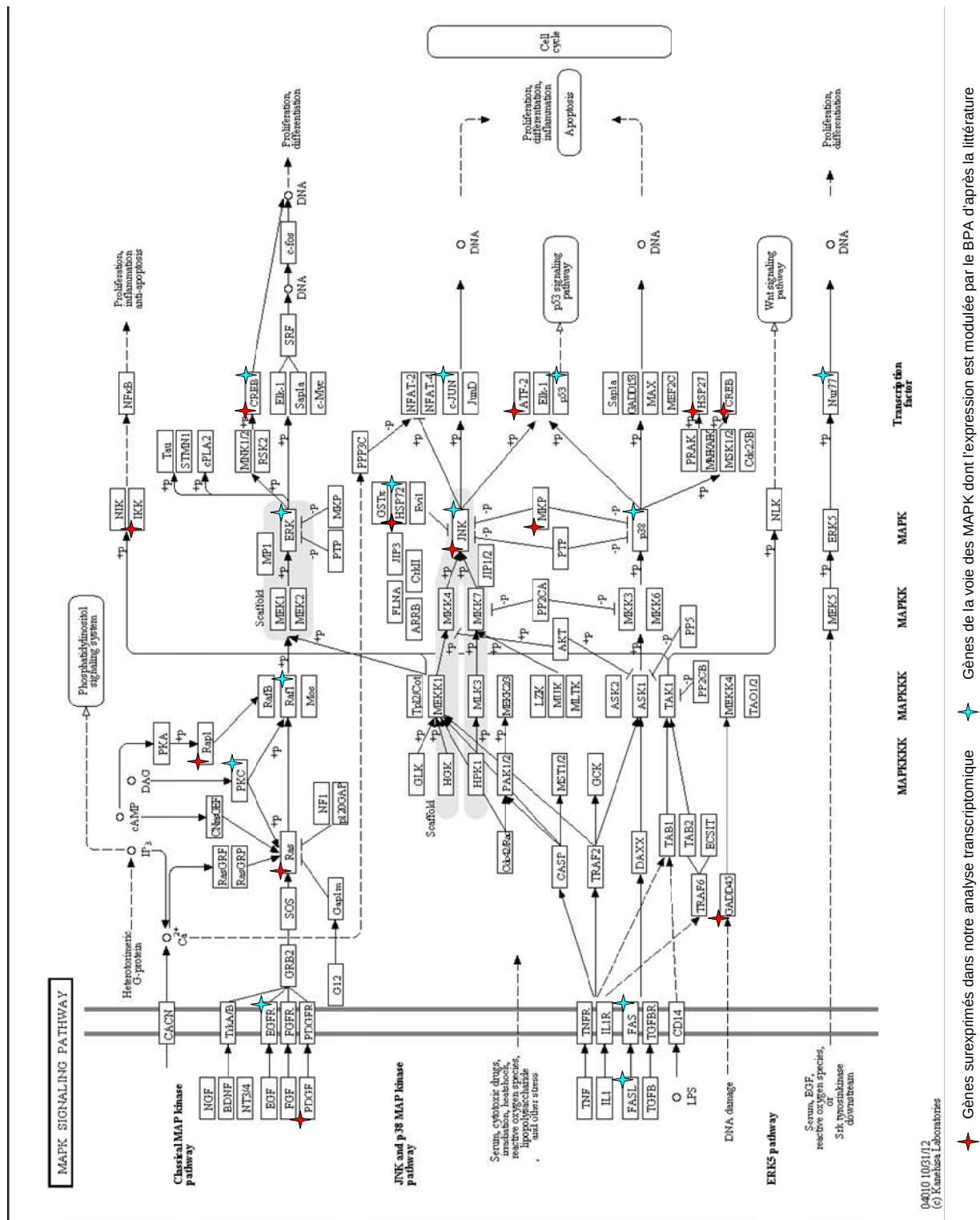


Figure 7 : Effet du BPA sur la voie de signalisation des MAP kinases (D'après KEGG Pathway)

Les croix rouges correspondent aux gènes surexprimés d'après les résultats de notre transcriptome. Les croix bleues correspondent aux gènes dont l'expression est modulée par le BPA, d'après plusieurs références bibliographiques.

III.D. Discussion

Dans nos études précédentes, nous avons observé les effets du BPA après 24 à 72h de traitement. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de modification de l'expression des quelques gènes étudiés mais ces gènes concernaient uniquement la stéroïdogénèse. Grâce à une analyse globale du transcriptome, nous avons mis en évidence plusieurs gènes dont l'expression est modifiée par le traitement de 6 heures au BPA à la dose de 10^{-7} M. Les pourcentages de modification du taux d'expression des gènes, 35% pour le gène le plus surexprimé et 26% pour le gène le plus réprimé, sont des pourcentages faibles. Cependant, les tests statistiques nous ont permis de mettre en évidence 1342 gènes dont l'expression est modulée de façon significative.

Parmi ces gènes, on retrouve les voies de signalisation des MAP kinases, du cycle cellulaire et du cytosquelette d'actine, toutes liées aux phénomènes de prolifération, apoptose ou différenciation des cellules. Ainsi, les résultats de cette analyse nous suggèrent que les phénotypes observés sur les cellules germinales de souris peuvent être dus à un arrêt du cycle à 24 h, menant à l'apoptose des cellules observable après 48 h de traitement. Toutefois, notre champ d'étude reste vaste, étant donné la quantité d'interactions possibles au sein de ces voies de signalisation. En nous basant sur ces données, nous pourrions dans un premier temps effectuer une étude ciblée du niveau d'expression de plusieurs gènes du cycle cellulaire, par qPCR. En réalisant une cinétique de traitement et en étudiant le niveau d'expression des principaux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, nous pourrions déterminer les protéines potentiellement responsables de l'effet anti-prolifératif et pro-apoptotique du BPA dans les cellules germinales. Nous nous focaliserons dans un premier temps sur plusieurs gènes décrits comme spécifiques du cycle cellulaire dans les cellules germinales tels que p15 et p16 (Fig. 8) (Western et al., 2008). Ceci nous permettra de mieux cerner les voies impliquées, cependant, le niveau d'expression des gènes ne donne qu'une information partielle si on ne connaît ni le taux d'expression protéique, ni le niveau d'activation et de phosphorylation des protéines. Des modifications, induites par le BPA, de plusieurs voies de signalisation retrouvées dans notre analyse transcriptomique ont

également été décrites dans la littérature. Dans des cellules embryonnaires de cerveau de rat, le BPA serait capable de bloquer les cellules en phase S et G2/M, et d'augmenter leur taux d'apoptose. L'étude démontre que le niveau de phosphorylation des protéines CREB et C-jun est diminué, et le niveau d'expression de Bax et P53, protéines pro-apoptotiques est augmenté (Liu et al., 2012). Dans une autre étude réalisée sur des cellules PC12, le BPA diminue le taux de phosphorylation de CREB et de MAPK (Seki et al., 2011). Enfin, dans une étude réalisée *in vivo* sur le testicule de rat, Thuillier et al. démontrent qu'un traitement au BPA en période fœtale entraîne une augmentation transitoire de l'expression de Raf1 et Erk1/2 au niveau transcriptionnel et protéique (Thuillier et al., 2009). Il sera important d'étudier par la suite dans notre modèle, les taux d'activation des différentes protéines, en mesurant par exemple les niveaux de phosphorylation des protéines appartenant aux voies transcriptionnellement altérées. Enfin, nous devons surtout essayer de corrélérer ces évènements avec l'effet physiologique observé, à savoir l'augmentation du taux d'apoptose mais aussi la diminution de la production de testostérone. Toutes ces études étant réalisées chez la souris, il faudra bien sûr vérifier nos hypothèses chez l'humain compte tenu des différentes réponses observées au niveau des doses efficaces, sur la stéroïdogénèse, mais sur aussi sur la gamétogénèse.

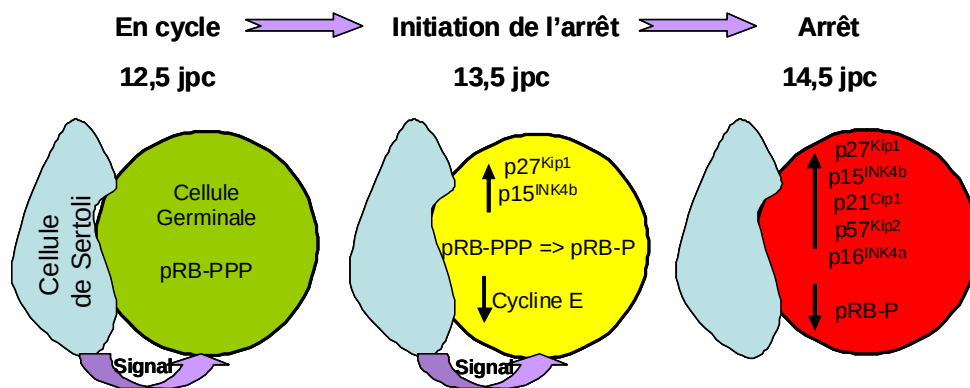


Figure 8 : Protéines du cycle cellulaire impliquées dans l'entrée en quiescence des cellules germinales chez la souris (D'après Western et al., 2008)

A 12,5 jpc, les cellules germinales prolifèrent et présentent une forme hyperphosphorylée de pRB. Elles reçoivent alors un signal extracellulaire qui induit l'initiation de l'arrêt du cycle. A 13,5 jpc, on observe avec l'arrêt mitotique une surexpression de p27^{Kip1} et p15^{INK4b} qui inhibent la phosphorylation de pRB en formant des complexes avec les cyclines E-cdk2 et D-cdk4/6. pRB active alors le checkpoint G1-S permettant l'arrêt mitotique. A 14,5 jpc, toutes les cellules germinales sont en arrêt, toutes les protéines pRB sont hypophosphorylées et commencent à être réprimées puis dégradées.

Article n°2

MEHP and PPARs agonists induce germ cells apoptosis and Stra8 overexpression in the mouse fetal testis

Thierry N'Tumba-Byn, Ali Lehraiki, Christine Levacher, Delphine Moison, Sébastien Messiaen, René Habert, Marie-Justine Guerquin, Virginie Rouiller-Fabre, Gabriel Livera

Depuis de nombreuses années, on observe dans les populations occidentales une augmentation de l'incidence de différentes pathologies liées au syndrome de dysgénésie testiculaire. Ce syndrome aurait pour origine l'influence délétère des polluants environnementaux sur le développement de la fonction de reproduction en période fœtale. Les phtalates, et notamment le DEHP, font partie des perturbateurs endocriniens reprotoxiques les plus produits et les plus répandus (Latini et al., 2006).

Plusieurs études ont démontré les effets délétères du DEHP et de son principal métabolite, le MEHP, sur plusieurs organes, dont le testicule fœtal (Caldwell, 2012, Rusyn and Corton, 2012). Dans des études antérieures effectuées au laboratoire, nous avons mis en évidence les effets délétères du MEHP sur le développement des cellules germinales dans le testicule fœtal. Le MEHP induit l'apoptose des gonocytes à la fois chez le rat, chez l'Homme et chez la souris (Chauvigne et al., 2009, Lambrot et al., 2009, Lehraiki et al., 2009).

Le but de la présente étude a été de déterminer les causes du déclenchement du processus apoptotique dans les cellules germinales après traitement au MEHP, puis d'étudier quelle voie de signalisation est activée par le MEHP pour induire ce phénotype.

Cependant, alors que le MEHP induit une forte apoptose des cellules germinales dans le testicule fœtal, chez la femelle, les cellules germinales ne subissent de modification de leur taux d'apoptose ni dans l'ovaire humain (Muczynski et al., 2012b), ni dans l'ovaire de souris (données non publiées). Partant de ce constat, nous avons dirigé nos recherches sur les événements cellulaires spécifiques de la gonade mâle par rapport à la gonade femelle et sur les gènes différenciellement exprimés entre le mâle et la femelle à 12,5 jpc. Chez la souris, jusqu'à 12,5 jpc, les gonocytes sont très similaires et expriment des marqueurs de pluripotence de type OCT3/4 et SSEA-1. En revanche, à partir de 12,5 jpc chez le mâle, les cellules commencent à perdre l'expression des marqueurs de pluripotence et amorcent leurs processus d'arrêt mitotique afin d'être en quiescence à 15,5 jpc (Olaso and Habert, 2000). Chez la femelle, à ce stade, les gonocytes initient leur processus méiotique et expriment les marqueurs spécifiques tels que *Stra8* ou *Dmc1* (Koubova et al., 2006, Pittman et al., 1998).

Sachant que l'apoptose peut être induite dans les cellules germinales lorsqu'elles sont dirigées vers un processus de différenciation erroné (MacLean et al., 2007, Suzuki and Saga, 2008), nous avons choisi d'étudier la différenciation des gonocytes mâles après traitement au MEHP, à travers l'expression de marqueurs de différenciation. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du gène *Stra8* après 24 heures de traitement au MEHP.

Ceci nous a conduits à une étude plus poussée des marqueurs exprimés par les cellules germinales mâles après traitement chez la souris. Cependant, le MEHP induit une apoptose drastique des gonocytes après trois jours de traitement qui empêche leur étude à moyen terme. Par conséquent, afin d'examiner l'évolution des cellules germinales sur plusieurs jours, nous avons dû contourner l'effet apoptotique induit par le MEHP. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris invalidées pour la protéine Bax, principale protéine de la voie d'apoptose intrinsèque. De façon intéressante, nous avons observé une survie des cellules germinales après traitement au MEHP.

Le principal rôle connu de *Stra8* étant son implication dans l'initiation de la méiose, nous avons recherché l'expression de marqueurs méiotiques dans les cellules germinales mâles de testicules de souris Bax $-/-$ traités au MEHP. Toutefois, aucun gonocyte ne semblait avoir initié de processus méiotique après trois jours de traitement au MEHP.

Parallèlement à ces études sur le statut de différenciation des cellules germinales mâles, nous avons également recherché la voie de signalisation activée par le MEHP dans le testicule fœtal de souris. Plusieurs études dans la littérature démontrent une activation des récepteurs PPARs par le MEHP (Lapinskas et al., 2005, Hurst and Waxman, 2003). Nous avons réalisé des cultures de testicule fœtal de souris de 12,5 jpc en présence d'un agoniste du récepteur PPAR α et en présence d'un agoniste de PPAR γ . Nous avons alors observé que ces deux agonistes entraînent les mêmes phénotypes que le MEHP, une augmentation du taux d'apoptose des cellules germinales, et une augmentation de l'expression du gène *Stra8*.

Ainsi, nous démontrons dans cette étude que le MEHP induit dans les cellules germinales une augmentation de l'expression du gène *Stra8*, pourtant spécifique de la différenciation femelle à ce stade de développement. Et nous démontrons également que la voie de signalisation des récepteurs PPARs est probablement la voie de signalisation impliquée dans les effets du MEHP sur le testicule fœtal de souris.

MEHP and PPARs agonists induce germ cells apoptosis and Stra8 overexpression in the mouse fetal testis

N'Tumba-Byn T.^{1,2,3}, Lehraiki A.^{1,2,3}, Levacher C.^{1,2,3}, Moison D.^{1,2,3}, Messiaen S.^{1,2,3}, Habert R.^{1,2,3}, Guerquin MJ.^{1,2,3}, Rouiller-Fabre F.^{1,2,3}, Livera G.^{1,2,3}

1 - Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Stem Cells and Radiation, BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

2 - CEA, DSV, IRCM, SCSR, LDG, 92265 Fontenay-aux-Roses, France;

3 - INSERM, Unité 967, F-92265, Fontenay aux Roses, France.

Corresponding author: Gabriel Livera (Professor), Unit of Stem Cells and Radiation, LDG / SCSR / IRCM / DSV, Centre CEA, BP6, F-92265, Fontenay aux Roses, France.

e-mail: gabriel.livera@cea.fr; Fax: (33) 1 46 54 99 06; Tel: (33) 1 46 54 94 99

Reprint request: Gabriel Livera

Running title: MEHP and PPAR agonists affect the mouse fetal testis

Competing financial interests: All the authors have nothing to declare.

Introduction

Concerns about the effects of endocrine disruptors (EDs), and especially phthalates, on the reproductive system have been rising for several years. Phthalate esters belong to a class of endocrine disrupting chemicals widely used as plasticizers in PVC plastics. Di-2-ethyl-hexyl phthalate (DEHP) is the most used phthalate in the plastic industry (Latini et al., 2006). It can be found in numerous products of common use, such as food containers, cosmetics, toys and clothes. As phthalates are not covalently bound to the plastic, then can leach out from the product and be absorbed by ingestion, inhalation or dermal contact (Heudorf et al., 2007, Petersen and Breindahl, 2000, Page and Lacroix, 1995). Once ingested, DEHP can be transformed by hepatic enzymes into different metabolites. Its main metabolite is the mono-2-ethyl-hexyl phthalate (MEHP), recognized as an active endocrine toxicant (Fisher, 2004).

The toxic effects of phthalates have been widely described in several organs, such as the liver, the brain, the thyroid and the reproductive system (Caldwell, 2012, Rusyn and Corton, 2012). Our study is focused on the testis, at fetal stage, a period of development particularly sensible to endocrine disruptors. Numerous studies have been performed to determine the effects of DEHP and MEHP on the testis and some of them described effects at fetal stage. While an absence of effect has been demonstrated on the testosterone secretion of human fetal testis (Lambrot et al., 2009), MEHP affects the testosterone secretion in the mouse and rat at fetal stage (Chauvigne et al., 2009, Lehraiki et al., 2009). Moreover, MEHP alters the gametogenesis in those three species. It has been reported that micromolar concentrations of MEHP induce the apoptosis of fetal germ cells and alters their number in the mouse, rat and human (Chauvigne et al., 2009, Lambrot et al., 2009, Lehraiki et al., 2009). Studies also demonstrated that phthalate treatments induce the occurrence of abnormal multinuclear germ cells in the mouse testis, although these cells may disappear later in the development (Gaido et al., 2007, Lehraiki et al., 2009). Alteration of the germ cells development may lead

to several pathologies at adult age, such as testicular cancer, oligospermia, azoospermia or aneuploidy issues.

Interestingly, the MEHP effect on the apoptosis of fetal germ cells is specific of the male gonad. In the female fetal gonad, the germ cell number and the apoptosis rate are not affected even by a 100 μ M MEHP treatment neither in the human ovary (Muczynski et al., 2012b) nor in the mouse ovary (unpublished data). One of the main differences in the development of male and female germ cells occurs in their differentiation at 12.5 days post-coitum (dpc). Indeed, until 12.5 dpc, XX and XY germ cells are considered identical. They proliferate actively and express markers of pluripotency such as Oct-3/4 and SSEA-1. Then, in the testis, germ cells undergo a proliferation and apoptosis phase until 14.5 dpc, where they become quiescent, and then proliferate again from 18.5 dpc to birth (Olaso and Habert, 2000). At the same stage, in the ovary, at 12.5 dpc, retinoic acid (RA) is secreted and germ cells enter into meiosis (Koubova et al., 2006). RA induces the overexpression of the gene *Stra8* (stimulated by retinoic acid 8), which is considered as a marker of meiosis entry (Menke et al., 2003). Moreover, it has been shown that *Stra8* is necessary to induce the expression of other markers of meiosis such as *Dmc1* (dosage suppressor of mck1 homolog) or *Sycp3* (synaptonemal complex protein 3) (Anderson et al., 2008, Baltus et al., 2006). In experimental models, female primordial germ cells (PGCs) can be prevented from meiosis entry when cultured with a RA inhibitor and continue to express markers of pluripotency such as Oct-3/4 (Bowles et al., 2006, Koubova et al., 2006, Trautmann et al., 2008). Conversely, in cultured male PGCs, RA treatment is able to induce *Stra8* (Menke et al., 2003, Oulad-Abdelghani et al., 1996), *Sycp3* (Dobson et al., 1994) and *Dmc1* (Pittman et al., 1998) expression. However, these modifications of the male germ cells differentiation induce their apoptosis. Moreover, in mice invalidated for *Nanos2* or *Cyp26B1*, which are two genes preventing meiosis in the fetal testis, the germ cells express meiotic markers and then die by apoptosis (Suzuki and Saga, 2008, MacLean et al., 2007). These data and the sex-specific phenotype observed after MEHP treatment, led us to study the differentiation state of germ

cells in the fetal testis. Our hypothesis is that in the fetal testis, MEHP may induce an inappropriate differentiation of germ cells, leading them to an induced apoptosis. While the apoptotic effect of MEHP on mouse fetal germ cells has already been demonstrated at 13.5 dpc (Lehraiki et al., 2009), we decided to perform our experiments at 12.5 dpc to study an earlier phase, where germ cells are less engaged into their differentiation process and potentially more sensible to alterations.

To understand the mechanisms involved in the phenotypes observed on the fetal testis after MEHP treatment, we focused on the PPARs (peroxisome proliferating activated receptor) pathway. Phthalates are known to have the ability to activate the PPARs, members of the nuclear receptor superfamily. The PPAR family is composed of three members: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) and PPAR γ (NR1C3). They are mostly involved in the lipid and cholesterol metabolism, and in fatty acid synthesis (Berger et al., 2005). The role of PPARs in the phthalate toxicity was first demonstrated in the liver. Phthalates induce an increase in the proliferation and an inhibition of the apoptosis of hepatocytes, leading to hepatomegaly and hepatocarcinoma (Rusyn et al., 2006). Several studies performed with plasmids containing reporter genes for the different PPARs showed that phthalates can directly activate the PPARs, and particularly PPAR α and PPAR γ (Lapinskas et al., 2005, Hurst and Waxman, 2003). Although there can be differences of activation levels between species, a study on a hepatocarcinoma cell line showed that PPAR γ is equally activated at similar concentrations of phthalates in mice and humans (Bility et al., 2004). Concerning the implication of PPARs in the effects of phthalates on the reproduction, a study on mice invalidated for PPAR α showed that the uro-genital tract was less affected by DEHP treatment in PPAR α $-/-$ mice than in wild-type (Ward et al., 1998). The invalidation of PPAR γ being lethal at 10 dpc (Barak et al., 1999), no study of the effect of phthalates on this knock-out model has been performed. In the rat fetal testis, DEHP or DiBP (di-isobutyl phthalate) treatments between 7 and 21 dpc induced an increase in the PPAR α gene expression and in the PPAR γ protein expression in the Leydig cells (Boberg et al., 2008, Borch et al., 2006b).

In another study, Ryu et al. demonstrate that the DEHP induces apoptosis in the rat testis via PPAR γ and the Erk1/2 pathway (Ryu et al., 2007).

In this study, to understand the cause of the MEHP-induced apoptosis of germ cells, we studied the differentiation state of male fetal germ cells after MEHP treatment. Then, using a Bax $-/-$ mice model to prevent the apoptosis in these cells, we examined the evolution of their differentiation with a specific marker of meiosis. Finally, in order to identify the pathway involved in the MEHP effects, we studied the phenotypes induced by specific PPARs agonists on the fetal testis.

Material and Methods

(cf. Chapitre « *Matériel et Méthodes* » du manuscrit)

Results

III.D.1. Effect of MEHP on the apoptosis and the number of germ cells in mouse

12.5 dpc testes were cultured in presence of 20 μ M of MEHP during 24h. An immunostaining with the cleaved caspase-3 antibody (Fig. 1A) was then performed and the percentage of cleaved caspase-3 positive germ cells was counted. The germ cell apoptosis rate was significantly increased by MEHP to 6.22% versus 3.06% in the control (Fig. 1B). After culture in presence of 20 μ M of MEHP during 72h, we performed an immunostaining with a vasa antibody to label gonocytes. While the global structure of seminiferous cords is conserved, very few vasa positive cells remain (Fig. 2). Although a rigorous cell counting has not been performed, the reduction in the number of germ cells is clearly visible after an MEHP treatment during 72h.

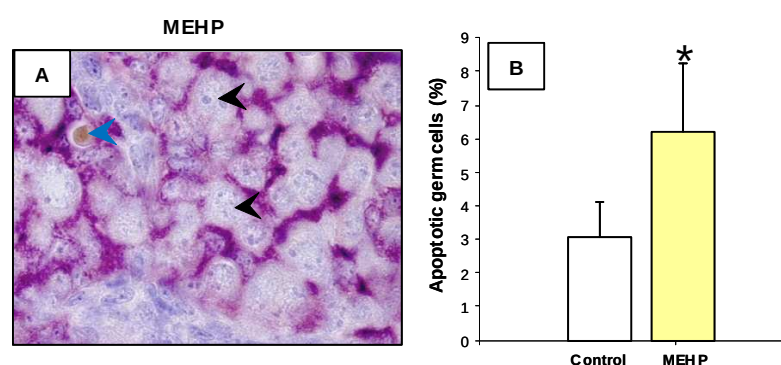


Figure 1 : Effect of a 24 h MEHP treatment on the apoptosis of male fetal germ cells in mouse

A: Illustration of a histological section of a 12.5 dpc fetal testis cultured during 24 h in presence of 20 μ M MEHP. The tissue is labelled with an AMH antibody (purple) and a cleaved caspase-3 antibody (brown). Black arrowhead: gonocyte. Blue arrowhead: apoptotic gonocyte. B: Percentage of apoptotic germ cells in fetal testes cultured during 24 h in presence or absence of 20 μ M MEHP. Values represent the mean $\pm$ SEM of 5 experiments. *, $p < 0.05$ in the statistical comparison between MEHP-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test.

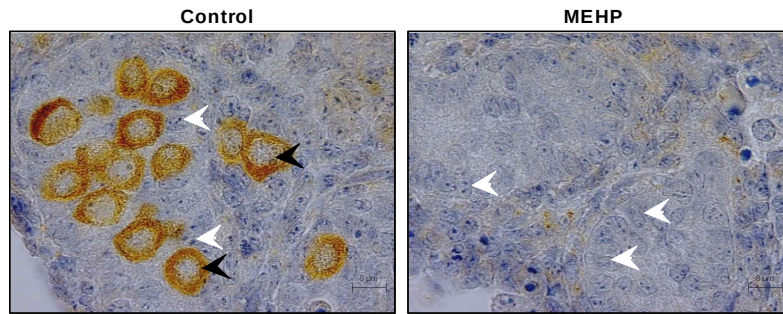


Figure 2 : Vasa immunostaining of fetal testes after 72h of culture with MEHP

Histological section of 12.5 dpc testes cultured during 72h in presence or absence of 20 μ M MEHP. Gonocytes are labelled with a vasa antibody (brown). Black arrowhead: gonocyte. White arrowhead: Sertoli cell. Bar represents 8 μ m.

III.D.2.Effect of MEHP on Stra8 expression

In order to verify the differentiation state of germ cells and their hypothetic progression toward meiosis initiation, we measured the mRNA level of *Stra8* expression, in 12.5 dpc testes cultured in presence or absence of 20 μ MEHP during 24 h. At the end of the culture, RT-qPCR amplification was performed. MEHP increases the expression of *Stra8* by 7.31 fold (Fig. 3A).

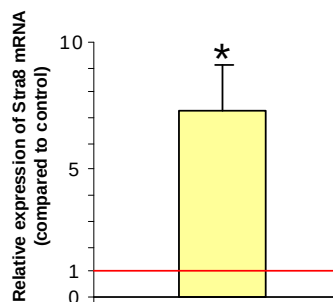


Figure 3 : Effect of MEHP on Stra8 expression

12.5 dpc testes were cultured during 24 h in presence or absence of 20 μ M MEHP. At the end of the cultured, RT-PCR amplification was performed. Values represent the mean $\pm$ SEM of *Stra8* mRNA level compared to β -actin and expressed as the ratio of the control values from 5 experiments. *, $p < 0.05$ in the statistical comparison between MEHP-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test.

III.D.3.Effect of MEHP on germ cells of BAX-/- mice

The increase in the *Stra8* expression led us to study the progression of germ cells during MEHP treatment. For this, we first had to investigate how to prevent them from entering into an apoptotic process after MEHP treatment using a Bax $-/-$ mice model.

Wild-type and Bax ^{-/-} C57BL/6 mice testes were cultured with 20 μ M MEHP or vehicle, during 72h. An immunostaining of the tissue with an vasa antibody was then performed to localize the germ cells. In wild-type, MEHP significantly reduces the number of germ cells while in Bax ^{-/-} mice, germ cells survived (Fig. 4). The apoptosis induced by MEHP is dependent of the Bax protein pathway.

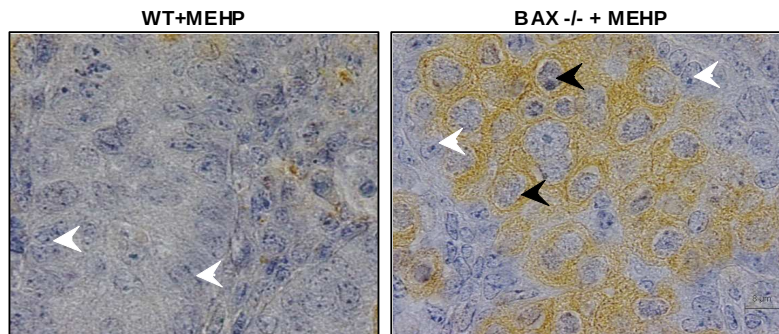


Figure 4 : Vasa immunostaining of fetal testes after MEHP treatment in wild-type and Bax ^{-/-} mice

Histological sections of 12.5 dpc fetal testes from wild-type or Bax ^{-/-} mice, cultured during 72 h in presence of 20 μ M MEHP. Gonocytes are labelled with a vasa antibody (brown). Black arrowhead: gonocyte. White arrowhead: Sertoli cell. Bar represents 8 μ m.

After the observation of the increased expression of Stra8 in the germ cells, the first hypothesis was to look for a meiosis entry in the surviving germ cells. We performed an immunostaining with a γ H2AX antibody to label the double-strand break into the meiotic germ cells. However, in the Bax ^{-/-} fetal testes treated with 20 μ M MEHP during 72 h, we did not find any germ cell labelled for γ H2AX (Fig. 5A), compared with a positive control of 12.5 dpc fetal ovary cultured during 72 h (Fig. 5B). MEHP increases Stra8 gene expression in the fetal testis without inducing meiosis.

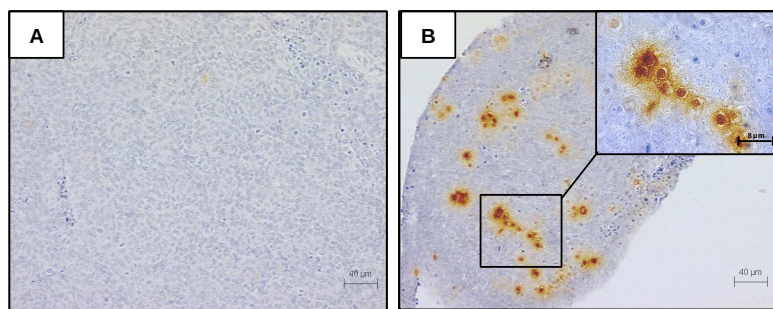


Figure 5 : γ H2AX immunostaining in fetal ovary and in Bax $-/-$ fetal testis after MEHP treatment

A: Histological section of a Bax $-/-$ 12.5 dpc fetal testis after 72 h of culture in presence of 20 μ M MEHP. Immunostaining for γ H2AX was performed. B: Histological section of a wild-type 12.5 dpc ovary cultured during 72 h in control medium. Immunostaining for γ H2AX was performed (brown).

III.D.4.Effect of PPAR α and PPAR γ agonists on the apoptosis of germ cells

To investigate whether the effect of MEHP in the germ cells involves the PPARs, we cultured the 12.5 dpc mice testes in presence of a PPAR γ agonist (GW1929) or a PPAR α agonist (GW7647). When the testis is cultured during 24h in presence of the PPAR α agonist at 10 μ M, the apoptosis rate is significantly increased from 6.2% to 16.09% (Fig. 6). When the testis is cultured during 24h in presence of the PPAR γ agonist at 10 μ M, the apoptosis is significantly increased from 4.82% to 17.4% (Fig. 6). As MEHP, PPARs agonists are able to induce a high level of apoptosis in the germ cells, and still maintain the global structure of testis.

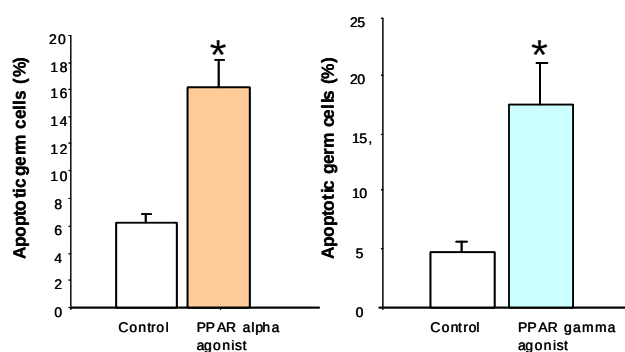


Figure 6 : Effect of PPARs agonists on the apoptosis of male fetal germ cells

12.5 dpc fetal testes were cultured during 24 h in presence of 10 μ M PPAR α agonist (GW7647), 10 μ M PPAR γ agonist (GW1929) or in control medium. Values represent the mean $\pm$ SEM of 5 experiments. *, $p < 0.05$ in the statistical comparison between PPAR agonist-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test.

III.D.5. Effect of PPARs agonists on *Stra8* expression

To compare the effects of MEHP and those of PPARs agonists we studied the expression of *Stra8* after agonists treatment during 24 h in 12.5 dpc fetal testes. Treatment with the PPAR α agonist at 10 μ M increases the *stra8* gene expression by 5.78 fold (Fig. 7). The treatment of the fetal testis with the PPAR γ agonist at 10 μ M increases the *stra8* gene expression by 15.34% (Fig. 7).

As MEHP, PPARs agonists can induce the expression of *Stra8* in the fetal testis.

Treatment of the fetal testis with PPAR agonists (10 μ M) and MEHP (20 μ M) simultaneously did not significantly modify the effect on the *Stra8* gene expression (Fig. 7), suggesting no additive effect.

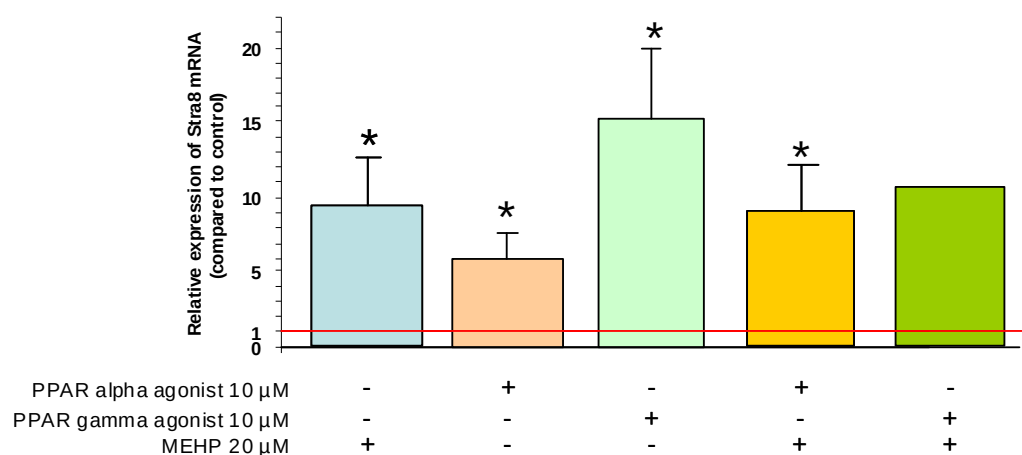


Figure 7: Effect of PPARs agonists on the mRNA expression of *Stra8*

12.5 dpc testes were cultured during 24 h in presence or absence of 20 μ M MEHP, 10 μ M PPAR α agonist (GW7647), 10 μ M PPAR γ agonist (GW1929) or in control medium. At the end of the culture, RT-PCR amplification was performed. Values represent the mean $\pm$ SEM of *Stra8* mRNA level compared to β -actin and expressed as the ratio of the control values from 2 to 5 experiments. *, $p < 0.05$ in the statistical comparison between PPAR agonist(+MEHP)-treated and control testes using the Wilcoxon's non-parametric paired test.

Discussion

The goal of this study was to improve the understanding of the apoptotic effect induced by the MEHP on the fetal testis germ cells in mouse. We observed that the increased apoptosis in germ cells comes with an increase in the expression of *Stra8*, marker of meiotic initiation. Then, to investigate the germ cells fate, we observed the effect of MEHP on Bax ^{-/-} fetal testes, to prevent the apoptotic effect of MEHP in germ cells. In treated Bax ^{-/-} mice, the germ cells survived, however, they did not enter into meiosis after a 72 h culture. In parallel, in order to identify the pathway triggered by MEHP on the germ cells, we performed fetal testes cultures in presence of PPARs agonists and found out that they induce the same phenotypes as MEHP, an increase in the apoptosis and the overexpression of *Stra8*.

MEHP induces *Stra8* expression but not meiosis initiation

We first had to confirm that 20 μ M MEHP induce an increase in the apoptosis rate of the germ cells at 12.5 dpc, like in 13.5 dpc testes. This was confirmed by a cell counting of cleaved-caspase 3 positive germ cells performed on fetal testes cultured with MEHP. After 24h of MEHP exposure, we observe a 2-fold increase of the percentage of apoptotic germ cells, and after a 72 h treatment, the amount of germ cells was drastically reduced until most seminiferous cords contained no germ cell at all, as previously seen in 13.5 dpc testes (Lehraiki et al., 2009). In normal condition, at 12.5 dpc, the seminiferous cords have just been formed. The germ cells, surrounded by Sertoli cells, are in a proliferative and apoptotic phase. At 13.5 dpc, they initiate their mitotic arrest, to be completely quiescent at 15.5 dpc (Olaso and Habert, 2000). Gonocytes progressively lose the expression of markers of pluripotency like SSEA-1 and Oct3/4 (Kudo et al., 2004, Gomperts et al., 1994), and gain the expression of markers such as p63 γ , member of the p53 family (Petre-Lazar et al., 2007) or 5-methylcytosine (5-mc), marker of DNA hypermethylation (Coffigny et al., 1999). In the ovary, at the same stage, germ cells enter into meiosis. At 12.5 dpc, *Stra8* is induced and allows meiosis initiation (Anderson et al., 2008). Afterwards, the germ cells express other meiosis specific genes such as *Sycp3*, *Dmc1*, or *Spo11*, responsible for the formation of the

synaptonemal complex, homologous recombination and double-strand breaks, respectively (Anderson et al., 2008, Baltus et al., 2006, Chuma and Nakatsuji, 2001). As described before, the MEHP induced germ cells apoptosis in the fetal testis, but not in the fetal ovary (unpublished data). At 12.5 dpc, the sex difference lies mainly in the meiosis entry, therefore, in male fetal germ cells after MEHP treatment, we investigated the level of expression of *Stra8*, which is increased before meiosis entry in physiological condition (Menke et al., 2003). MEHP increased *Stra8* expression by 7.31 fold. This result may be associated with the apoptosis triggered in the germ cells. Indeed, in a 13.5 dpc testis cultured in the presence of RA, the factor inducing *Stra8* expression, the apoptosis rate of germ cells is massively increased (Trautmann et al., 2008). This can be related to an inappropriate differentiation state. Indeed, in the same model, RA induced a delay in the extinction of the marker of pluripotency SSEA-1 and in the expression of the quiescence marker 5-mc (Trautmann et al., 2008). Germ cells apoptosis is often associated to a default of male differentiation. Moreover, in mice invalidated for specific markers of male germ cells, such as *Nanos2* or *Cyp26B1* the germ cells differentiate in an inappropriate context and die by a Bax dependant apoptosis, thus involving the intrinsic pathway (MacLean et al., 2007, Suzuki and Saga, 2008).

Further studies had to be performed to characterize the differentiation state of the gonocytes after MEHP treatment. However, as MEHP induces a high rate of apoptosis in the germ cells after 72 h, it was not possible to examine the effect of MEHP on the progress of these cells. In order to prevent the germ cells to go into apoptosis, we decided to work with a Bax knock-out mouse strain. The apoptotic pathway triggered by MEHP in the fetal testis was not known. Several previous results in our lab showed that the *Fas* and *FasL* expression were not modified at the transcriptional level. Moreover, we did not see any change in the expression of caspase-8 which is responsible for the extrinsic apoptotic pathway induced by Fas (data not shown). Thus, the Bax protein involved in the intrinsic apoptotic pathway seemed to be an interesting hypothesis to investigate. MEHP was described as increasing the mRNA Bax expression and reducing the expression of Bcl-2 in several models such as

the human monocyte leukemia U937 cell line (Yokoyama et al., 2003) or the mouse ovarian antral follicles (Wang et al., 2012). Interestingly, we observed that in Bax ^{-/-} fetal testes, the germ cells survive after a 20 μ M MEHP treatment during 72 h, unlike the wild-type. By preventing the MEHP-induced apoptosis of germ cells, this model allowed us to perform further studies on the effect of MEHP on the development of the germ cells.

Stra8 is believed to regulate the meiotic initiation in the testis and the ovary, under the stimulation of the RA (Anderson et al., 2008). Although the fact that *Stra8* and RA are physiologically involved in the fetal meiosis initiation is subject to debate (Mark et al., 2008), it is nonetheless proven that the meiotic initiation is preceded by an increase in the expression of *Stra8*. Therefore, we investigated the meiotic status of the germ cells after a 72 h MEHP treatment in the Bax ^{-/-} fetal testes. For this, we performed an immunostaining for γ -H2AX, marker of double-strand breaks that appear during the first meiotic division. We observed no γ -H2AX staining in the surviving germ cells after MEHP treatment. *Stra8* is overexpressed without inducing meiosis. Either *Stra8* is not sufficient to trigger meiosis, or there is another parameter preventing the testis to enter meiosis. In an *in vitro* model of fetal ovary cultured with a nearby fetal testis, it was shown that a diffusible factor coming from the testis was able to prevent the meiosis in the ovary germ cells (Guerquin et al., 2010). This diffusible substance, called meiosis inhibiting factor is potentially expressed as soon as 12.5 dpc, when the somatic cells are developed. As described before, the fate of germ cells can be reversed only at earlier stages of development (Adams and McLaren, 2002, Bowles et al., 2006). Indeed, RA can induce a meiosis entry on XY gonads but only when treated at a sexually undifferentiated state (Bowles et al., 2006, Ohta et al., 2012, Trautmann et al., 2008). In order to know if MEHP can induce the meiosis of germ cells, testes should be treated earlier in their development, at 11.5 dpc, when the cells are undifferentiated, and the testis does not secrete its meiosis inhibiting factor. Thus, increasing the *Stra8* expression at a sexually undifferentiated state, MEHP might induce meiosis in male fetal germ cells.

Stra8 is not related only to the meiosis initiation. Few data are available on the roles of this protein but in a recent study, *Stra8* was found to promote the susceptibility to germ cells teratoma in the mouse. The percentage of mice developing a teratoma was decreased from 8% in the wild-type and heterozygous to 1% in *Stra8* ^{-/-} mice (Heaney et al., 2012). In normal condition, at 12.5 dpc, SSEA-1 and other markers of pluripotency are highly expressed in gonocytes, and their expression decreases during the following days (Gomperts et al., 1994, Kudo et al., 2004). However, in the same study, the pattern of expression of genes of pluripotency was also associated with cancer susceptibility. Mice with a higher expression of markers of pluripotent germ cells, like Nanog or Ngn3 (neurogenin 3), presented a higher susceptibility to teratoma (Heaney et al., 2012). As MEHP is already associated with an increase in the proliferation of germ cells (Lehraiki et al., 2009), a delay in their differentiation could make a more solid link to a potential cancerization. Exposure to Di-(n-butyl) phthalate delays the differentiation of germ cells in the rat testis. DnBP is able to maintain the expression of the marker of pluripotency Oct-4 and to maintain the proliferation of the germ cells (Ferrara et al., 2006). To extend the amount of data on the differentiation status of gonocytes, these markers of pluripotency or differentiation should be researched in germ cells treated with MEHP.

Involvement of the PPARs pathway

Obviously, the role of *Stra8* is mainly linked to RA and its specific receptors, known as RARs (retinoic acid receptors). Our new data on the effect of MEHP on the expression of *Stra8* led us to investigate the RARs pathway. Our first data on RAR invalidated mice suggested that the RAR α pathway was not involved on the MEHP treatment (data not shown). We focused our study on another pathway, the PPARs, given that MEHP is known to activate the PPARs (Hurst and Waxman, 2003). First, we observed that PPAR α and PPAR γ agonists induce an increase in the apoptosis rate of fetal germ cells. The PPARs pathway is related to apoptotic induction in several models, and particularly in cancer cells (Elrod and Sun, 2008, Yang and Frucht, 2001) and in the testis (Ryu et al., 2007). The absence of additive effect of PPAR

agonists and MEHP suggests that they do not act via different pathway. We also observed that PPAR α can significantly stimulate the expression of PPAR γ in our model. Our hypothesis is that whether we use a PPAR α or a PPAR γ agonist, the pathway activated is the PPAR γ pathway. To validate this hypothesis, further studies disrupting the PPAR γ pathway should be performed. We first tried to study the effects of a simultaneous treatment with MEHP and a PPAR γ antagonist (GW9662), but the question of its specificity was raised when no antagonist effect was found. We decided to use a model of mice invalidated for PPAR γ . The PPAR γ invalidation being lethal at 10 dpc, due to placental communication defaults (Barak et al., 1999), we are developing a model of conditional knock-out system. We will then be able to study the effect of MEHP on fetal germ cells of mice lacking the PPAR γ receptor.

Conclusion

This study provides new insights on the effects of MEHP on the fetal germ cells. The upregulation of the *Stra8* gene expression could be linked to developmental modifications induced in gonocytes. In parallel, we set the basis for a study of the involvement of the PPARs pathway. Further studies on knock-out mouse models should be performed.

Références bibliographiques

- ADAMS, I. R. & MCLAREN, A. 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, 129, 1155-64.
- ANDERSON, E. L., BALTUS, A. E., ROEPERS-GAJADIEN, H. L., HASSOLD, T. J., DE ROOIJ, D. G., VAN PELT, A. M. & PAGE, D. C. 2008. *Stra8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14976-80.
- BARAK, Y., NELSON, M. C., ONG, E. S., JONES, Y. Z., RUIZ-LOZANO, P., CHIEN, K. R., KODER, A. & EVANS, R. M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 4, 585-95.
- BERGER, J. P., AKIYAMA, T. E. & MEINKE, P. T. 2005. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 244-51.
- BILITY, M. T., THOMPSON, J. T., MCKEE, R. H., DAVID, R. M., BUTALA, J. H., VANDEN HEUVEL, J. P. & PETERS, J. M. 2004. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol Sci*, 82, 170-82.
- BOBERG, J., METZDORFF, S., WORTZIGER, R., AXELSTAD, M., BROKKEN, L., VINGGAARD, A. M., DALGAARD, M. & NELLEMAN, C. 2008. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology*, 250, 75-81.

- BORCH, J., METZDORFF, S. B., VINGGAARD, A. M., BROKKEN, L. & DALGAARD, M. 2006. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology*, 223, 144-55.
- BOWLES, J., KNIGHT, D., SMITH, C., WILHELM, D., RICHMAN, J., MAMIYA, S., YASHIRO, K., CHAWENGSAKSOPHAK, K., WILSON, M. J., ROSSANT, J., HAMADA, H. & KOOPMAN, P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 312, 596-600.
- CALDWELL, J. C. 2012. DEHP: genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms-a review. *Mutat Res*, 751, 82-157.
- CHAUUVIGNE, F., MENUET, A., LESNE, L., CHAGNON, M. C., CHEVRIER, C., REGNIER, J. F., ANGERER, J. & JEGOU, B. 2009. Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect*, 117, 515-21.
- CHUMA, S. & NAKATSUJI, N. 2001. Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev Biol*, 229, 468-79.
- COFFIGNY, H., BOURGEOIS, C., RICOUL, M., BERNARDINO, J., VILAIN, A., NIVELEAU, A., MALFOY, B. & DUTRILLAUX, B. 1999. Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis. *Cytogenet Cell Genet*, 87, 175-81.
- DOBSON, M. J., PEARLMAN, R. E., KARAIKAKIS, A., SPYROPOULOS, B. & MOENS, P. B. 1994. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci*, 107 (Pt 10), 2749-60.
- ELROD, H. A. & SUN, S. Y. 2008. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. *PPAR Res*, 2008, 704165.
- FERRARA, D., HALLMARK, N., SCOTT, H., BROWN, R., MCKINNELL, C., MAHOOD, I. K. & SHARPE, R. M. 2006. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology*, 147, 5352-62.
- FISHER, J. S. 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*, 127, 305-15.
- GAIDO, K. W., HENSLEY, J. B., LIU, D., WALLACE, D. G., BORGHOF, S., JOHNSON, K. J., HALL, S. J. & BOEKELHEIDE, K. 2007. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci*, 97, 491-503.
- GOMPERTS, M., WYLIE, C. & HEASMAN, J. 1994. Primordial germ cell migration. *Ciba Found Symp*, 182, 121-34; discussion 134-9.
- GUERQUIN, M. J., DUQUENNE, C., LAHAYE, J. B., TOURPIN, S., HABERT, R. & LIVERA, G. 2010. New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Dev Biol*, 346, 320-30.
- HEANEY, J. D., ANDERSON, E. L., MICHELSON, M. V., ZECHEL, J. L., CONRAD, P. A., PAGE, D. C. & NADEAU, J. H. 2012. Germ cell pluripotency, premature differentiation and susceptibility to testicular teratomas in mice. *Development*, 139, 1577-86.
- HEUDORF, U., MERSCH-SUNDERMANN, V. & ANGERER, J. 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*, 210, 623-34.
- HURST, C. H. & WAXMAN, D. J. 2003. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci*, 74, 297-308.
- KOUBOVA, J., MENKE, D. B., ZHOU, Q., CAPEL, B., GRISWOLD, M. D. & PAGE, D. C. 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2474-9.
- KUDO, T., KANEKO, M., IWASAKI, H., TOGAYACHI, A., NISHIHARA, S., ABE, K. & NARIMATSU, H. 2004. Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. *Mol Cell Biol*, 24, 4221-8.
- LAMBROT, R., MUCZYNSKI, V., LECUREUIL, C., ANGENARD, G., COFFIGNY, H., PAIRAULT, C., MOISON, D., FRYDMAN, R., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2009. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect*, 117, 32-7.

- LAPINSKAS, P. J., BROWN, S., LEESNITZER, L. M., BLANCHARD, S., SWANSON, C., CATTLEY, R. C. & CORTON, J. C. 2005. Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*, 207, 149-63.
- LATINI, G., DEL VECCHIO, A., MASSARO, M., VERROTTI, A. & C, D. E. F. 2006. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr Med Chem*, 13, 2527-34.
- LEHRAIKI, A., RACINE, C., KRUST, A., HABERT, R. & LEVACHER, C. 2009. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci*, 111, 372-82.
- MACLEAN, G., LI, H., METZGER, D., CHAMBON, P. & PETKOVICH, M. 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology*, 148, 4560-7.
- MARK, M., JACOBS, H., OULAD-ABDELGHANI, M., DENNEFELD, C., FERET, B., VERNET, N., CODREANU, C. A., CHAMBON, P. & GHYSELINCK, N. B. 2008. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci*, 121, 3233-42.
- MENKE, D. B., KOUBOVA, J. & PAGE, D. C. 2003. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol*, 262, 303-12.
- MUCZYNSKI, V., LECUREUIL, C., MESSIAEN, S., GUERQUIN, M. J., N'TUMBA-BYN, T., MOISON, D., HODROJ, W., BENJELLOUN, H., BAIJER, J., LIVERA, G., FRYDMAN, R., BENACHI, A., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2012. Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving LXR α in Human Fetal Testis and Ovary. *PLoS One*, 7, e48266.
- OHTA, K., YAMAMOTO, M., LIN, Y., HOGG, N., AKIYAMA, H., BEHRINGER, R. R. & YAMAZAKI, Y. 2012. Male differentiation of germ cells induced by embryonic age-specific Sertoli cells in mice. *Biol Reprod*, 86, 112.
- OLASO, R. & HABERT, R. 2000. Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *J Androl*, 21, 497-511.
- OULAD-ABDELGHANI, M., BOUILLET, P., DECIMO, D., GANSMULLER, A., HEYBERGER, S., DOLLE, P., BRONNER, S., LUTZ, Y. & CHAMBON, P. 1996. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol*, 135, 469-77.
- PAGE, B. D. & LACROIX, G. M. 1995. The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit Contam*, 12, 129-51.
- PETERSEN, J. H. & BREINDAHL, T. 2000. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam*, 17, 133-41.
- PITTMAN, D. L., COBB, J., SCHIMENTI, K. J., WILSON, L. A., COOPER, D. M., BRIGNULL, E., HANDEL, M. A. & SCHIMENTI, J. C. 1998. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell*, 1, 697-705.
- RUSYN, I. & CORTON, J. C. 2012. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutat Res*, 750, 141-58.
- RUSYN, I., PETERS, J. M. & CUNNINGHAM, M. L. 2006. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol*, 36, 459-79.
- RYU, J. Y., WHANG, J., PARK, H., IM, J. Y., KIM, J., AHN, M. Y., LEE, J., KIM, H. S., LEE, B. M., YOO, S. D., KWACK, S. J., OH, J. H., PARK, K. L., HAN, S. Y. & KIM, S. H. 2007. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and ERK 1/2 activation in testis of Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A*, 70, 1296-303.
- SUZUKI, A. & SAGA, Y. 2008. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev*, 22, 430-5.
- TRAUTMANN, E., GUERQUIN, M. J., DUQUENNE, C., LAHAYE, J. B., HABERT, R. & LIVERA, G. 2008. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle*, 7, 656-64.
- WANG, W., CRAIG, Z. R., BASAVARAJAPPA, M. S., HAFNER, K. S. & FLAWS, J. A. 2012. Mono (2-ethylhexyl) Phthalate Induces Oxidative Stress and Inhibits Growth of Mouse Ovarian Antral Follicles. *Biol Reprod*.

- WARD, J. M., PETERS, J. M., PERELLA, C. M. & GONZALEZ, F. J. 1998. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol*, 26, 240-6.
- YANG, W. L. & FRUCHT, H. 2001. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 22, 1379-83.
- YOKOYAMA, Y., OKUBO, T., KANO, I., SATO, S. & KANO, K. 2003. Induction of apoptosis by mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) in U937 cells. *Toxicol Lett*, 144, 371-81.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'articule autour de l'étude de l'effet du BPA et du MEHP sur le développement du testicule fœtal. Ces deux plastifiants sont considérés comme des perturbateurs endocriniens et sont pourtant très répandus dans les produits de consommation courante. Ce travail avait deux objectifs : i) étudier les effets de doses environnementales de BPA sur le testicule fœtal humain et comparer ces effets à ceux observés dans les modèles rongeurs classiquement utilisés dans les études de reprotoxicité ii) comprendre les mécanismes impliqués dans les effets du MEHP sur le testicule fœtal murin.

L'étude des effets de doses environnementales de BPA sur le testicule fœtal humain a permis la publication d'un article ayant une portée importante en santé publique. En effet, le premier atout de notre publication est l'utilisation de doses environnementales de BPA dans un modèle de culture de testicule fœtal humain. Nous avons démontré que le BPA diminue significativement le taux de sécrétion de testostérone et l'expression de l'*INSL-3* durant le premier trimestre de la grossesse, chez l'Homme, à des doses similaires à celles retrouvées dans les fluides biologiques. De plus, cet article permet de soulever la question des résultats apportés par les études expérimentales réalisées chez l'animal et leur extrapolation à l'Homme. Notre étude a été réalisée sur des explants testiculaires cultivés exactement dans les mêmes conditions grâce au système de culture organotypique, dans trois espèces différentes, le rat, la souris et l'Homme. Nous avons démontré que le testicule fœtal humain possède une sensibilité plus importante que les testicules de rongeurs. Enfin, notre article pose les bases pour une étude des mécanismes d'action et des récepteurs impliqués dans les effets du BPA. Grâce à l'analyse des effets du DES, perturbateur endocrinien dont les récepteurs cibles sont connus, nous avons pu émettre l'hypothèse d'un effet du BPA indépendant des récepteurs classiques des œstrogènes. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée dans un modèle de souris invalidée pour ces récepteurs.

La deuxième partie de ce travail de thèse a pu être réalisée grâce à plusieurs études menées précédemment dans notre laboratoire sur les effets délétères du MEHP. Plusieurs études ont montré l'effet pro-apoptotique du MEHP sur les gonocytes du testicule fœtal chez l'Homme, la souris et le rat. Nous souhaitons dorénavant étudier les causes de cette apoptose en réalisant une étude expérimentale chez la souris, sous deux aspects différents. Premièrement, nous avons démontré que le traitement au MEHP induit la surexpression de *Stra8* dans le testicule fœtal. Le gène *Stra8* étant associé à l'initiation de la méiose, l'apoptose des cellules germinales mâles pourrait être due à un défaut de différenciation des cellules induit par le MEHP. En parallèle, nous étudions la voie de signalisation activée par le MEHP afin d'induire l'apoptose des cellules germinales. L'activation des récepteurs PPARs, connus pour être impliqués dans la réponse au MEHP constitue notre hypothèse la plus

solide. Nous avons par ailleurs observé que les agonistes de PPAR α et de PPAR γ ont la capacité d'induire l'apoptose des cellules germinales, et également d'induire une augmentation de l'expression du gène *Stra8*. Ces expérimentations font l'objet d'un article en cours d'écriture.

I. Effets du BPA sur le testicule fœtal.

I.A. Culture organotypique et différences inter-espèces

Les études de toxicologie chez l'Homme sont principalement limitées aux études épidémiologiques tentant d'établir des liens entre l'apparition de pathologies et l'exposition préalable à un perturbateur endocrinien. Les modèles animaux sont et resteront des modèles pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens et de leurs mécanismes d'action. Ils permettent, dans les limites des conditions d'éthique, de réaliser des expérimentations dans les conditions d'exposition souhaitées. Le modèle animal permet *in vivo*, de travailler à une dose donnée, avec une période d'exposition donnée, au niveau de différents tissus. Cependant, il restera toujours un biais évident, quant à l'extrapolation des données animales à une exposition humaine. Ce biais est en parti contourné par les cultures *in vitro* de lignées de cellules humaines. Ce modèle permet d'étudier les effets directs des perturbateurs sur un type cellulaire donné. Il est intéressant d'utiliser ce genre de modèle lorsqu'on connaît le degré de toxicité du perturbateur. Ce modèle permet alors d'étudier au niveau moléculaire les interactions modifiées par le perturbateur. En revanche, ce modèle ne permet pas non plus d'extrapoler sur l'effet physiologique observé *in vivo* sur ces mêmes cellules, au sein du tissu. Nos études sont réalisées sur un autre modèle *in vitro*, la culture organotypique. Ce système nous permet de cultiver des explants pendant plusieurs jours, tout en conservant la structure interne du tissu prélevé (Lambrot et al., 2006b, Livera et al., 2006). Il est ainsi possible d'étudier l'effet de perturbateurs sur les tissus dans un contexte où les interactions cellulaires sont conservées. Cependant, ce modèle possède aussi ses limites, bien que l'étude d'un tissu permette une analyse plus étendue que l'étude d'une lignée cellulaire, nous sommes encore loin de l'effet observé dans un organisme entier. De plus, ce modèle restreint la période d'exposition à un temps de culture limité. La durée maximale de culture que nous avons réalisée pour le testicule fœtal humain est de quinze jours, mais même si les structures sont bien conservées, au-delà, la perte de cellules germinales devient trop importante.

Grâce à ce modèle de culture, et à la collaboration que nous avons établie depuis plusieurs années avec le service de gynécologie-obstétrique de l'Hôpital Antoine Béchère, nous pouvons cultiver des explants testiculaires de fœtus issus d'IVG, donc récupérés au cours du premier trimestre de la grossesse. Ainsi, en réalisant des explantations de testicule fœtal de la même façon chez les rongeurs, nous avons la possibilité d'effectuer une étude comparative stricte, de l'effet du BPA sur le testicule fœtal dans trois espèces. La période choisie (1er trimestre chez l'Homme, 12.5 jpc chez la souris et 14.5 jpc chez le rat) correspond à la fenêtre de masculinisation décrite comme étant particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens (Welsh et al., 2008). Le tissu ayant été prélevé à une période de développement similaire chez le rat, la souris et l'Homme, ceci nous a permis de conclure quant à la sensibilité au BPA. *In vitro*, la stéroïdogénèse fœtale humaine est affectée par des concentrations de BPA plus faibles que la stéroïdogénèse fœtale des rongeurs. Cette différence de sensibilité entre la souris et l'Homme a déjà été décrite par notre équipe lors d'une étude sur les effets du cadmium. En effet le testicule fœtal humain est plus sensible à l'effet délétère du cadmium sur les cellules germinales que le testicule fœtal murin (Angenard et al., 2010). En dehors de cette différence de sensibilité entre les trois espèces étudiées, il est important de noter que de façon plus générale, des différences de réponse aux perturbateurs endocriniens ont également été observées entre espèces. Ainsi, *in vitro*, le MEHP exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de testostérone chez le rat (Chauvigne et al., 2009) alors qu'il est sans effet chez l'Homme (Lambrot et al., 2009). D'autre part chez la souris, l'effet peut être nul, positif ou négatif en fonction de l'âge des fœtus à l'explantation et des conditions de culture (Lehraiki et al., 2009). De même, nous avons montré que le DES exerce un effet négatif sur la stéroïdogénèse fœtale chez la souris et le rat alors qu'il est sans effet chez l'Homme (N'tumba-byn et al., 2012). *In vivo*, de telles différences de réponse sont également fréquemment rencontrées lors d'expositions *in utero* avec le BPA. En effet le BPA est connu pour exercer à l'âge adulte un effet négatif sur la sécrétion de testostérone et le nombre de spermatozoïdes (Salian et al., 2009b), alors que chez la souris, aucun effet n'est observé sur la stéroïdogénèse (Okada and Kai, 2008). Enfin, il est également remarquable que dans la même espèce, des résultats différents peuvent être observés en fonction des souches utilisées.

Ces données se révèlent importantes pour les agences de sécurité sanitaires. En absence d'étude chez l'humain, les agences doivent déterminer les NOAEL et DJA en se basant sur les études expérimentales animales. Aujourd'hui, grâce à des modèles tels que la culture organotypique, les résultats obtenus devraient permettre d'affiner les données sur les concentrations nocives pour l'Homme, et d'établir des NOAEL et DJA plus adaptées.

I.B. Un effet à doses environnementales

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées afin de tenter d'établir des corrélations entre l'exposition des populations humaines au BPA et l'apparition de différentes pathologies, notamment les pathologies liées au développement de la fonction de reproduction. Ce grand nombre d'étude donne pourtant lieu à des controverses quant aux concentrations de BPA retrouvées dans les fluides biologiques. Il est important de différencier les taux de BPA libre des taux de BPA sous forme conjuguée. Le BPA libre étant la forme biologiquement active capable de lier les différents récepteurs, la plupart des études récentes s'attachent à distinguer les différentes formes de BPA. Le BPA libre serait présent à des concentrations sanguines comprises entre 2 et $40 \cdot 10^{-9} \text{M}$ (Vandenberg et al., 2010). Cependant, une autre étude décrit que les concentrations de BPA libre, qui ne représenterait que 0,2 à 1,2% du BPA total dans l'organisme, seraient de l'ordre de 10^{-10}M dans le plasma (Teeguarden et al., 2011). Cette étude remet en cause les précédentes sur les méthodes de dosage. Cependant, quelque soit la dose relevée dans les fluides biologiques, peu de conclusions ont pu être tirées quant au lien avec d'éventuelles pathologies. Il est en effet difficile d'établir un lien entre un toxique à faible demi-vie dans l'organisme, et l'apparition d'une pathologie précise. Le BPA est rapidement éliminé par l'organisme, c'est l'exposition chronique à laquelle nous sommes soumis dans notre mode de vie qui permet au BPA d'exercer ses effets toxiques. Néanmoins, la période fœtale étant une période particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens, les données sur les concentrations de BPA libre relevées dans le sang de femmes enceintes ($1,7 \cdot 10^{-8} \text{M}$) (Vandenberg et al., 2010) ou dans le sang de cordon ombilical ($4,9 \cdot 10^{-9} \text{M}$) (Fenichel et al., 2012) sont d'une profonde importance.

Ainsi, notre étude démontre qu'à des concentrations proches des concentrations environnementales auxquelles est exposé un fœtus, le BPA exerce un effet délétère sur la sécrétion de testostérone et sur l'expression de l'Insl-3, en période fœtale. Il est important de noter que les concentrations utilisées dans notre modèle de culture ont été vérifiées. En effet, dans la mesure où la culture repose sur l'utilisation de boîtes de culture et d'inserts composés de plastique, nous avons fait doser par l'intermédiaire de l'équipe Toxalim de Toulouse, les concentrations de BPA présentes dans nos milieux de culture. L'absence de BPA dans nos milieux témoins ($< 4 \cdot 10^{-9} \text{M}$), nous a permis de vérifier le non « relargage » du BPA à partir des plastiques de culture. De même, nous avons également vérifié que nous retrouvions bien en fin de culture les concentrations de BPA correspondant aux concentrations à tester choisies (N'tumba-byn et al., 2012).

Nos résultats peuvent avoir un impact conséquent en santé publique. Nous sommes exposés de façon chronique à une dose nocive de BPA pouvant entraîner des défauts de masculinisation et des pathologies liées au syndrome de dysgénésie testiculaire. Il est important de noter que les études épidémiologiques apportant des données concernant une corrélation entre l'exposition fœtale au BPA et les caractères de masculinisation tels que la cryptorchidie ou la distance ano-génitale sont contradictoires, certaines concluent qu'une corrélation existe (Miao et al., 2011), d'autres non (Fenichel et al., 2012). Toutefois, le principe de précaution devrait être appliqué et les populations à risque comme les femmes enceintes et les jeunes enfants devraient être protégées de cette exposition, même à faible dose.

I.C. Mécanismes d'action

Enfin, pour compléter cette étude, il est particulièrement pertinent de déterminer par quel mécanisme d'action le BPA opère ses effets délétères. Il est capable de se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes ($ER\alpha$, $ER\beta$) mais avec une faible affinité, 10 000 fois inférieure à celle de l'œstradiol (Kuiper et al., 1998). En comparant les effets du BPA à ceux du DES, perturbateur œstrogénique dont on connaît les mécanismes d'action via le récepteur classique des œstrogènes $ER\alpha$ (Delbès et al., 2005), nous avons pu mettre en évidence des pistes d'étude des mécanismes d'action mis en jeu. Le DES induit une diminution de sécrétion de testostérone dans le testicule fœtal chez la souris, le rat mais pas chez l'Homme. Ceci nous a permis de poser l'hypothèse selon laquelle le BPA et le DES agissent par deux voies de signalisation différentes. Nous avons confirmé cette théorie en démontrant dans une lignée de souris invalidées pour le récepteur $ER\alpha$ (Delbès et al., 2005) que le BPA possède toujours un effet sur la sécrétion de testostérone. La piste de ce récepteur classique des œstrogènes étant exclue, nous orientons nos recherches vers les récepteurs non classiques des œstrogènes GPR30 et $ERR\gamma$, également capables de lier le BPA (Okada et al., 2008, Takayanagi et al., 2006, Thomas and Dong, 2006). Ces récepteurs, présents dans le testicule fœtal chez l'Homme et chez la souris (données personnelles) doivent faire l'objet d'études approfondies sur leur implication éventuelle dans les effets du BPA.

La compréhension du mécanisme d'action du BPA permettrait d'anticiper les effets éventuels des substituts. En effet, l'interdiction de l'utilisation du BPA dans les produits destinés aux nourrissons et dans les contenants alimentaires a été votée récemment en France, et depuis plusieurs années dans d'autres pays. Les industriels doivent donc utiliser des substituts, qui leur permettent de conserver les propriétés plastiques du BPA. Parmi les substituts déjà

utilisés dans l'industrie afin de remplacer le BPA, on compte le bisphénol S, le bisphénol F, le bisphénol A diglycidyl ether (BADGE) ou encore l'Irganox. Cependant, nous ne possédons pour le moment que peu de recul quant à la toxicité de ces produits. On sait déjà que le BPS possède la capacité de se lier aux récepteurs des œstrogènes (Grignard et al., 2012), comme le BPA et le DES. Il sera important par la suite de mesurer son degré de toxicité, ainsi que celui des autres substituts. D'une façon plus générale, la compréhension des mécanismes d'action du BPA devrait nous permettre de définir des signatures moléculaires communes à d'autres perturbateurs endocriniens.

II. Effets du MEHP sur le testicule fœtal

Les effets des phtalates et notamment du MEHP sont assez largement décrits dans la littérature. Par ailleurs plusieurs études menées, pour certaines, dans notre laboratoire ont démontré que le MEHP possède un fort effet pro-apoptotique sur les cellules germinales du testicule fœtal, à la fois chez le rat (Chauvigne et al., 2009), la souris (Lehraiki et al., 2009) et chez l'Homme (Lambrot et al., 2009). Chez la souris, après trois jours de culture, le MEHP à la dose de 20 μ M induit une perte quasi-totale des gonocytes. Le but de notre étude a été de mieux caractériser les mécanismes d'action des phtalates entraînant l'apoptose des cellules germinales dans le testicule fœtal de souris.

II.A. Stra8 et différenciation

L'une des particularités de l'effet apoptotique du MEHP sur les cellules germinales est son caractère spécifique au testicule. En effet, dans l'ovaire, le MEHP n'induit pas l'apoptose des gonocytes fœtaux chez l'humain (Muczynski et al., 2012b), ni chez la souris (données non publiées). Partant de ce constat, nous avons dirigé nos recherches sur les événements cellulaires spécifiques de la gonade mâle par rapport à la gonade femelle et sur les gènes différentiellement exprimés entre le mâle et la femelle à 12,5 jpc. Il est bien connu que dans l'ovaire, les cellules germinales entrent en méiose pendant la vie foetale sous l'effet de l'acide rétinoïque (Koubova et al., 2006). En revanche, le testicule exprime des « répresseurs » de méiose comme *Cyp26b1*, qui dégrade l'acide rétinoïque (Koubova et al., 2006, MacLean et al., 2007) et *Nanos2*, qui inhibe l'action de l'acide rétinoïque (Suzuki and Saga, 2008). Ces facteurs empêchent donc l'entrée des gonocytes en méiose qui entrent alors en quiescence. D'autre part, plusieurs études ont montré que des testicules fœtaux cultivés en présence d'acide rétinoïque expriment certains gènes de méiose comme *Stra8* et *Dmc1* qui ne sont normalement spécifiquement exprimés que dans l'ovaire à cet âge

(Koubova et al., 2006, Trautmann et al., 2008, Zhou et al., 2008a). On observe également l'expression anormale de gènes de méiose dans des testicules fœtaux (13,5 jpc) de souris invalidées pour *Cyp26b1* (MacLean et al., 2007) ou *Nanos2* (Suzuki and Saga, 2008). Dans tous ces cas les gonocytes meurent par apoptose, comme dans le cas d'une exposition au MEHP. Ces observations nous ont amené à émettre l'hypothèse selon laquelle le MEHP pourrait exercer son effet apoptotique en induisant une méiose erronée dans le testicule par interaction avec la voie de l'acide rétinoïque. Ainsi, l'augmentation de *Stra8* nous a tout d'abord conduit à l'étude des récepteurs spécifiques de l'acide rétinoïque, les RARs. Toutefois, des travaux préliminaires ayant été réalisés au laboratoire sur des souris invalidées pour le récepteur RAR α montrent que les effets du MEHP n'impliquent pas le récepteur RAR α (données non publiées).

Nous avons mis en évidence une augmentation du niveau d'expression du gène *Stra8* dans le testicule fœtal de souris de 12,5 jpc cultivé en présence de MEHP. *Stra8* est considéré comme le gène initiateur de la méiose dans les cellules germinales. En effet, les facteurs déclenchant le processus méiotique ne sont pas parfaitement connus, cependant, de nombreuses données indiquent que le gène *Stra8*, sous l'influence de la sécrétion d'acide rétinoïque serait l'un des facteurs indispensables à l'initiation de la méiose. Ce processus, qui permet le développement des cellules germinales en gamètes fonctionnelles débute pendant la vie fœtale chez la femelle et à la puberté chez le mâle. L'augmentation de l'expression du gène *Stra8* chez le mâle en période fœtale, due au MEHP, nous a amenés à analyser l'état de développement des cellules germinales après traitement.

Pour cela, nous avons cherché à contourner l'effet apoptotique du MEHP, afin de pouvoir étudier le développement des cellules germinales après plusieurs jours de traitement. Les données bibliographiques nous ont dirigés vers la voie intrinsèque de l'apoptose et la protéine Bax (Wang et al., 2012, Yokoyama et al., 2003). Nous avons donc étudié l'effet du MEHP sur le développement du testicule fœtal de souris invalidées pour le gène Bax. Après 72 h de traitement au MEHP, les cellules germinales de testicules fœtaux Bax $-/-$ survivent, contrairement aux cellules germinales des souris sauvages, ce qui met en évidence l'implication de la voie d'apoptose intrinsèque. Ces résultats nous ont donc permis d'une part d'apporter de nouveaux éléments quant à la voie de signalisation de l'apoptose impliquée dans les effets du MEHP, et d'autre part, ce modèle nous a permis par la suite d'étudier la progression des cellules germinales après 72 h de traitement au MEHP.

Notre première investigation s'est concentrée sur le déclenchement de la méiose dans les cellules germinales fœtales. En utilisant un marqueur spécifique des cassures doubles-brin apparaissant en début de division méiotique, nous avons recherché les gonocytes entrées

en méiose en réponse à l'augmentation de *Stra8*. Cependant, aucune cellule germinale fœtale n'est entrée en méiose après traitement au MEHP, malgré l'augmentation de l'expression de *Stra8*. Ce résultat suggère que soit *Stra8* n'est pas le seul facteur permettant l'entrée en méiose, soit il existe d'autres facteurs capables d'inhiber l'entrée en méiose dans le testicule fœtal. Des études ont montré qu'effectivement, *Stra8* nécessite la présence d'autres gènes tels que *Dazl* afin d'initier la méiose dans le testicule (Lin et al., 2008b). D'autre part, la notion de facteur inhibiteur de méiose sécrété par le testicule fœtal a également été démontrée (Trautmann et al., 2008).

Stra8 ne semble donc pas impliqué uniquement dans les processus méiotiques et leur initiation. Le rôle de cette protéine est très peu décrit dans la littérature, néanmoins, une étude récente a mis en évidence son implication dans la susceptibilité au cancer (Heaney et al., 2012). En effet, dans une lignée de souris invalidées pour le gène *Stra8*, le pourcentage de souris atteintes de tératomes testiculaires est réduit par rapport aux souris sauvages. Dans cette même étude, l'état de différenciation des cellules germinales a été observé, et l'expression élevée de gènes de pluripotence est corrélée à une plus forte susceptibilité à la formation de tératomes. Ceci nous a amenés à étudier également l'état de différenciation des cellules germinales après traitement au MEHP. Cependant, l'expression de SSEA-1, marqueur de pluripotence des gonocytes n'est pas modifiée par le traitement au MEHP.

Afin de conclure quant aux causes de l'induction de l'apoptose dans les cellules germinales et le rôle de la surexpression de *Stra8* dans ces cellules, de nouvelles études doivent être menées. Notamment il serait intéressant d'étudier l'expression d'autres marqueurs de pluripotence et de différenciation dont l'expression a pu être modifiée par le MEHP.

II.B. Implication de la voie des PPARs

Afin de comprendre les mécanismes d'action mis en jeu, il est également fondamental de connaître les récepteurs impliqués dans les effets du MEHP. Les récepteurs de la famille des PPARs, impliqués principalement dans le métabolisme lipidique, la synthèse des acides gras et du cholestérol, sont les cibles des phtalates les plus décrites (Hurst and Waxman, 2003). Nous avons donc recherché l'implication de ces récepteurs dans les effets du MEHP dans notre modèle. Après traitement des testicules fœtaux en présence des agonistes de PPAR α (Brown et al., 2001) ou de PPAR γ (Lehmann et al., 1995), nous avons observé une augmentation du taux d'apoptose des gonocytes, comme avec le MEHP. Les effets pro-apoptotiques de l'activation de la voie des PPARs ont été décrits dans plusieurs études, particulièrement dans les cellules cancéreuses (Elrod and Sun, 2008, Yang and Frucht, 2001) et également dans le testicule (Ryu et al., 2007). En plus, de l'effet pro-apoptotique,

nous observons également une augmentation de l'expression de *Stra8* après traitement avec les agonistes des PPARs. Ceci renforce l'idée d'une action du MEHP via ces récepteurs. Par ailleurs, en traitant les testicules fœtaux de souris simultanément avec le MEHP et l'un des agoniste des PPARs, nous n'observons pas d'effet additif. Ce résultat suggère l'activation d'une seule et même voie de signalisation.

L'hypothèse de l'activation de la voie des PPARs par le MEHP doit être confirmée en étudiant les effets du MEHP après blocage de cette voie. Nous avons réalisé des études préliminaires de cultures de testicule fœtal de souris en présence de MEHP et d'un antagoniste des PPARs, cependant, nous n'avons observé aucun effet de l'antagoniste. La question de la spécificité de l'antagoniste étant posée, nous avons décidé d'opter pour un modèle de souris transgéniques. L'invalidation de PPAR γ étant létale à 10 jpc (Barak et al., 1999), nous développons un modèle d'invalidation conditionnelle, sous contrôle d'une Cre inducible par le tamoxifen (le gène floxé de PPAR γ est sous le contrôle d'une Cre inducible après injection de tamoxifen). Ceci nous permettra de muter le gène PPAR γ juste avant le traitement au MEHP et ainsi d'étudier ses effets en absence de PPAR γ . Les souris sont actuellement au laboratoire et les croisements effectués afin d'obtenir les différents génotypes souhaités (PPAR γ_{flox} / PPAR γ_{flox} ; Cre+/Cre- et PPAR γ_{flox} / PPAR γ_{flox} ; Cre+/Cre+) sont en cours de réalisation. Malheureusement, le temps nécessaire à l'obtention des différents génotypes ne nous a pas permis d'obtenir de résultats dans le temps imparti pour ma thèse.

Enfin, si ces résultats s'avèrent concluant, nous tenterons de mettre en évidence une éventuelle liaison directe de PPAR γ dans la région promotrice du gène *Stra8* en mesurant, en présence de MEHP ou de l'agoniste de PPAR γ , l'activité luciférase dans une construction plasmidique contenant le promoteur de *Stra8*.

L'ensemble de nos résultats montre de potentiels effets délétères des deux plastifiants les plus produits et auxquels nous sommes le plus exposés. Le fait de combiner des études de reprotoxicité et de recherche des mécanismes d'action devrait nous permettre de progresser à la fois dans le domaine de la recherche fondamentale et également en santé publique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ADAMS, I. R. & MCLAREN, A. 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, 129, 1155-64.
- AHO, M., KOIVISTO, A. M., TAMMELA, T. L. & AUVINEN, A. 2000. Is the incidence of hypospadias increasing? Analysis of Finnish hospital discharge data 1970-1994. *Environ Health Perspect*, 108, 463-5.
- AKINGBEMI, B. T., YOUKER, R. T., SOTTAS, C. M., GE, R., KATZ, E., KLINEFELTER, G. R., ZIRKIN, B. R. & HARDY, M. P. 2001. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod*, 65, 1252-9.
- AKRE, O., PETTERSSON, A. & RICHIARDI, L. 2009. Risk of contralateral testicular cancer among men with unilaterally undescended testis: a meta analysis. *Int J Cancer*, 124, 687-9.
- AKRE, O. & RICHIARDI, L. 2009. Does a testicular dysgenesis syndrome exist? *Hum Reprod*, 24, 2053-60.
- ALAM, M. S., OHSAKO, S., MATSUWAKI, T., ZHU, X. B., TSUNEKAWA, N., KANAI, Y., SONE, H., TOHYAMA, C. & KUROMARU, M. 2010. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction*, 139, 427-37.
- ALBRECHTSEN, R., NIELSEN, M. H., SKAKKEBAEK, N. E. & WEWER, U. 1982. Carcinoma in situ of the testis. Some ultrastructural characteristics of germ cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A*, 90, 301-3.
- ALBRO, P. W., CORBETT, J. T., SCHROEDER, J. L., JORDAN, S. & MATTHEWS, H. B. 1982. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect*, 45, 19-25.
- ALMSTRUP, K., NIELSEN, J. E., MLYNARSKA, O., JANSEN, M. T., JORGENSEN, A., SKAKKEBAEK, N. E. & RAJPERT-DE MEYTS, E. 2010. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br J Cancer*, 103, 1269-76.
- ANDERSEN, J., THORPE, S. M., ROSE, C., CHRISTENSEN, I., RASMUSSEN, B. B. & POULSEN, H. S. 1991. Estrogen receptor in primary breast cancer estimated in paraffin-embedded tissue. A study of its usefulness compared to dextran-coated charcoal assay. *Acta Oncol*, 30, 685-90.
- ANDERSON, E. L., BALTUS, A. E., ROEPERS-GAJADIEN, H. L., HASSOLD, T. J., DE ROOIJ, D. G., VAN PELT, A. M. & PAGE, D. C. 2008. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14976-80.
- ANDERSON, R. A., CAMBRAY, N., HARTLEY, P. S. & MCNEILLY, A. S. 2002. Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin beta-glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction*, 123, 779-88.
- ANGENARD, G., MUCZYNSKI, V., COFFIGNY, H., DUQUENNE, C., FRYDMAN, R., HABERT, R., LIVERA, G. & ROUILLER-FABRE, V. 2011. In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells. *Reprod Toxicol*, 31, 470-6.
- ANGENARD, G., MUCZYNSKI, V., COFFIGNY, H., PAIRAULT, C., DUQUENNE, C., FRYDMAN, R., HABERT, R., ROUILLER-FABRE, V. & LIVERA, G. 2010. Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. *Environ Health Perspect*, 118, 331-7.
- AOKI, T. & TAKADA, T. 2012. Bisphenol A modulates germ cell differentiation and retinoic acid signaling in mouse ES cells. *Reprod Toxicol*, 34, 463-70.
- ARANGO, N. A., LOVELL-BADGE, R. & BEHRINGER, R. R. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, 99, 409-19.

- ATKIN, N. B. & BAKER, M. C. 1982. Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet*, 2, 1349.
- AUGER, J., KUNSTMANN, J. M., CZYGLIK, F. & JOUANNET, P. 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*, 332, 281-5.
- AUHAREK, S. A., DE FRANCA, L. R., MCKINNELL, C., JOBLING, M. S., SCOTT, H. M. & SHARPE, R. M. 2010. Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology*, 151, 2868-75.

B

- BAGHERI-FAM, S., SIM, H., BERNARD, P., JAYAKODY, I., TAKETO, M. M., SCHERER, G. & HARLEY, V. R. 2008. Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev Biol*, 314, 71-83.
- BAILLET, A., MANDON-PEPIN, B., VEITIA, R. & COTINOT, C. 2011. [Genetics of early ovarian differentiation: recent data]. *Biol Aujourd'hui*, 205, 201-21.
- BAKER, M. L. & HUTSON, J. M. 1993. Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab*, 76, 245-7.
- BALBONI, G. C., BARNI, T., GLORIA, L., FORTI, G. & VANNELLI, G. B. 1995. Alfa-inhibin and transferrin in human fetal testis. *Ital J Anat Embryol*, 100 Suppl 1, 519-24.
- BALTUS, A. E., MENKE, D. B., HU, Y. C., GOODHEART, M. L., CARPENTER, A. E., DE ROOIJ, D. G. & PAGE, D. C. 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*, 38, 1430-4.
- BARAK, Y., NELSON, M. C., ONG, E. S., JONES, Y. Z., RUIZ-LOZANO, P., CHIEN, K. R., KODER, A. & EVANS, R. M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 4, 585-95.
- BARAKAT, B., ITMAN, C., MENDIS, S. H. & LOVELAND, K. L. 2012. Activins and inhibins in mammalian testis development: new models, new insights. *Mol Cell Endocrinol*, 359, 66-77.
- BARBER, E. D., FOX, J. A. & GIORDANO, C. J. 1994. Hydrolysis, absorption and metabolism of di(2-ethylhexyl) terephthalate in the rat. *Xenobiotica*, 24, 441-50.
- BARRIONUEVO, F. J., BURGOS, M., SCHERER, G. & JIMENEZ, R. 2012. Genes promoting and disturbing testis development. *Histol Histopathol*, 27, 1361-83.
- BARSOUM, I. B. & YAO, H. H. 2010. Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl*, 31, 11-5.
- BASKIN, L. S. 2000. Hypospadias and urethral development. *J Urol*, 163, 951-6.
- BAY, K., ASKLUND, C., SKAKKEBAEK, N. E. & ANDERSSON, A. M. 2006. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20, 77-90.
- BECKER, K., GOEN, T., SEIWERT, M., CONRAD, A., PICK-FUSS, H., MULLER, J., WITTASSEK, M., SCHULZ, C. & KOLOSSA-GEHRING, M. 2009. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health*, 212, 685-92.
- BENDSEN, E., BYSKOV, A. G., LAURSEN, S. B., LARSEN, H. P., ANDERSEN, C. Y. & WESTERGAARD, L. G. 2003. Number of germ cells and somatic cells in human fetal testes during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod*, 18, 13-8.
- BERENSZTEIN, E. B., SCIARA, M. I., RIVAROLA, M. A. & BELGOROSKY, A. 2002. Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 5113-8.
- BERGER, J. P., AKIYAMA, T. E. & MEINKE, P. T. 2005. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 244-51.

- BHATTACHARYA, N., DUFOUR, J. M., VO, M. N., OKITA, J., OKITA, R. & KIM, K. H. 2005. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biol Reprod*, 72, 745-54.
- BIASON-LAUBER, A. 2010. Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24, 163-86.
- BIASON-LAUBER, A., KONRAD, D., MEYER, M., DEBEAUFORT, C. & SCHOENLE, E. J. 2009. Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am J Hum Genet*, 84, 658-63.
- BIEDERMANN, S., TSCHUDIN, P. & GROB, K. 2010. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem*, 398, 571-6.
- BILITY, M. T., THOMPSON, J. T., MCKEE, R. H., DAVID, R. M., BUTALA, J. H., VANDEN HEUVEL, J. P. & PETERS, J. M. 2004. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol Sci*, 82, 170-82.
- BITGOOD, M. J., SHEN, L. & MCMAHON, A. P. 1996. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, 6, 298-304.
- BLOOMGARDEN, Z. T., FUTTERWEIT, W. & PORETSKY, L. 2001. Use of insulin-sensitizing agents in patients with polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract*, 7, 279-86.
- BOBERG, J., METZDORFF, S., WORTZIGER, R., AXELSTAD, M., BROKKEN, L., VINGGAARD, A. M., DALGAARD, M. & NELLEMAN, C. 2008. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology*, 250, 75-81.
- BOEKELHEIDE, K., KLEYMENOVA, E., LIU, K., SWANSON, C. & GAIDO, K. W. 2009. Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc Res Tech*, 72, 629-38.
- BORCH, J., AXELSTAD, M., VINGGAARD, A. M. & DALGAARD, M. 2006a. Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicol Lett*, 163, 183-90.
- BORCH, J., DALGAARD, M. & LADEFOGED, O. 2005. Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA--apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol*, 19, 517-25.
- BORCH, J., LADEFOGED, O., HASS, U. & VINGGAARD, A. M. 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol*, 18, 53-61.
- BORCH, J., METZDORFF, S. B., VINGGAARD, A. M., BROKKEN, L. & DALGAARD, M. 2006b. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology*, 223, 144-55.
- BORNEHAG, C. G., LUNDGREN, B., WESCHLER, C. J., SIGSGAARD, T., HAGERHED-ENGMAN, L. & SUNDELL, J. 2005. Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics. *Environ Health Perspect*, 113, 1399-404.
- BOUILLET, P., OULAD-ABDELGHANI, M., VICAIRE, S., GARNIER, J. M., SCHUHBAUR, B., DOLLE, P. & CHAMBON, P. 1995. Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev Biol*, 170, 420-33.
- BOUSKINE, A., NEBOUT, M., BRUCKER-DAVIS, F., BENAHMED, M. & FENICHEL, P. 2009. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect*, 117, 1053-8.
- BOWLES, J., KNIGHT, D., SMITH, C., WILHELM, D., RICHMAN, J., MAMIYA, S., YASHIRO, K., CHAWENGSAKSOPHAK, K., WILSON, M. J., ROSSANT, J., HAMADA, H. & KOOPMAN, P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 312, 596-600.

- BOWLES, J. & KOOPMAN, P. 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction*, 139, 943-58.
- BRANDENBERGER, A. W., TEE, M. K., LEE, J. Y., CHAO, V. & JAFFE, R. B. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 3509-12.
- BRENNAN, J. & CAPEL, B. 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*, 5, 509-21.
- BRENNAN, J., TILMANN, C. & CAPEL, B. 2003. Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev*, 17, 800-10.
- BROWN, P. J., STUART, L. W., HURLEY, K. P., LEWIS, M. C., WINEGAR, D. A., WILSON, J. G., WILKISON, W. O., ITTOOP, O. R. & WILLSON, T. M. 2001. Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett*, 11, 1225-7.
- BUEHR, M., GU, S. & MCLAREN, A. 1993. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, 117, 273-81.

C

- CALAFAT, A. M., YE, X., WONG, L. Y., REIDY, J. A. & NEEDHAM, L. L. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, 116, 39-44.
- CALDWELL, J. C. 2012. DEHP: genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms-a review. *Mutat Res*, 751, 82-157.
- CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N. & SKAKKEBAEK, N. E. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305, 609-13.
- CASTEDO, S. M., DE JONG, B., OOSTERHUIS, J. W., SERUCA, R., BUIST, J. & KOOPS, H. S. 1988. Cytogenetic study of a combined germ cell tumor of the testis. *Cancer Genet Cytogenet*, 35, 159-65.
- CHAUUVIGNE, F., MENUET, A., LESNE, L., CHAGNON, M. C., CHEVRIER, C., REGNIER, J. F., ANGERER, J. & JEGOU, B. 2009. Time- and dose-related effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect*, 117, 515-21.
- CHEN, T. M., KUO, P. L., HSU, C. H., TSAI, S. J., CHEN, M. J., LIN, C. W. & SUN, H. S. 2007. Microsatellite in the 3' untranslated region of human fibroblast growth factor 9 (FGF9) gene exhibits pleiotropic effect on modulating FGF9 protein expression. *Hum Mutat*, 28, 98.
- CHEVALIER, N., BOUSKINE, A. & FENICHEL, P. 2012. Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. *Int J Cancer*, 130, 241-2.
- CHRISTIANSEN, S., BOBERG, J., AXELSTAD, M., DALGAARD, M., VINGGAARD, A. M., METZDORFF, S. B. & HASS, U. 2010. Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol*, 30, 313-21.
- CHUMA, S. & NAKATSUJI, N. 2001. Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev Biol*, 229, 468-79.
- CLARK, A. M., GARLAND, K. K. & RUSSELL, L. D. 2000. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod*, 63, 1825-38.
- CLAUSEN, P. A., HANSEN, V., GUNNARSEN, L., AFSHARI, A. & WOLKOFF, P. 2004. Emission of di-2-ethylhexyl phthalate from PVC flooring into air and uptake in dust: emission and sorption experiments in FLEC and CLIMPAQ. *Environ Sci Technol*, 38, 2531-7.
- CLERMONT, Y. & PEREY, B. 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat*, 100, 241-67.

- CODESAL, J., REGADERA, J., NISTAL, M., REGADERA-SEJAS, J. & PANIAGUA, R. 1990. Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *J Anat*, 172, 103-14.
- COFFIGNY, H., BOURGEOIS, C., RICOUL, M., BERNARDINO, J., VILAIN, A., NIVELEAU, A., MALFOY, B. & DUTRILLAUX, B. 1999. Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis. *Cytogenet Cell Genet*, 87, 175-81.
- COLVIN, J. S., WHITE, A. C., PRATT, S. J. & ORNITZ, D. M. 2001. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development*, 128, 2095-106.
- COOKE, J. E., GODIN, I., FFRENCH-CONSTANT, C., HEASMAN, J. & WYLIE, C. C. 1993. Culture and manipulation of primordial germ cells. *Methods Enzymol*, 225, 37-58.
- CORTES, D., MULLER, J. & SKAKKEBAEK, N. E. 1987. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*, 10, 589-96.
- CORTON, J. C. & LAPINSKAS, P. J. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci*, 83, 4-17.
- COWARD, P., LEE, D., HULL, M. V. & LEHMANN, J. M. 2001. 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8880-4.
- CRAVEDI, J. P., ZALKO, D., SAVOURET, J. F., MENUET, A. & JEGOU, B. 2007. [The concept of endocrine disruption and human health]. *Med Sci (Paris)*, 23, 198-204.
- CULTY, M. 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87, 1-26.
- CULTY, M., THUILLIER, R., LI, W., WANG, Y., MARTINEZ-ARGUELLES, D. B., BENJAMIN, C. G., TRIANTAFILOU, K. M., ZIRKIN, B. R. & PAPADOPOULOS, V. 2008. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod*, 78, 1018-28.

D

- DAMSTRA, T., PAGE, S. W., HERRMAN, J. L. & MEREDITH, T. 2002. Persistent organic pollutants: potential health effects? *J Epidemiol Community Health*, 56, 824-5.
- DEKEYSER, J. G., LAURENZANA, E. M., PETERSON, E. C., CHEN, T. & OMIECINSKI, C. J. 2011. Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor. *Toxicol Sci*, 120, 381-91.
- DELBES, G., LEVACHER, C., DUQUENNE, C., RACINE, C., PAKARINEN, P. & HABERT, R. 2005. Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 146, 2454-61.
- DELBES, G., LEVACHER, C. & HABERT, R. 2006. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*, 132, 527-38.
- DO, R. P., STAHLHUT, R. W., PONZI, D., VOM SAAL, F. S. & TAYLOR, J. A. 2012. Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses. *Reprod Toxicol*, 34, 614-621.
- DOBSON, M. J., PEARLMAN, R. E., KARAIKAKIS, A., SPYROPOULOS, B. & MOENS, P. B. 1994. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci*, 107 (Pt 10), 2749-60.
- DUFOUR, J. M., VO, M. N., BHATTACHARYA, N., OKITA, J., OKITA, R. & KIM, K. H. 2003. Peroxisome proliferators disrupt retinoic acid receptor alpha signaling in the testis. *Biol Reprod*, 68, 1215-24.

E

- ELROD, H. A. & SUN, S. Y. 2008. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. *PPAR Res*, 2008, 704165.
- EMA, M. & MIYAWAKI, E. 2001. Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod Toxicol*, 15, 261-7.
- EVEILLARD, A., MSELLI-LAKHAL, L., MOGHA, A., LASSERRE, F., POLIZZI, A., PASCUSI, J. M., GUILLOU, H., MARTIN, P. G. & PINEAU, T. 2009. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol*, 77, 1735-46.

F

- FACEMIRE, C. F., GROSS, T. S. & GUILLETTE, L. J., JR. 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 4, 79-86.
- FENICHEL, P., DECHAUX, H., HARTHE, C., GAL, J., FERRARI, P., PACINI, P., WAGNER-MAHLER, K., PUGEAT, M. & BRUCKER-DAVIS, F. 2012. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod*, 27, 983-90.
- FERRARA, D., HALLMARK, N., SCOTT, H., BROWN, R., MCKINNELL, C., MAHOOD, I. K. & SHARPE, R. M. 2006. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology*, 147, 5352-62.
- FISHER, J. S. 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*, 127, 305-15.
- FISHER, J. S., MACPHERSON, S., MARCHETTI, N. & SHARPE, R. M. 2003. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod*, 18, 1383-94.
- FORAND, A., MESSIAEN, S., HABERT, R. & BERNARDINO-SGHERRI, J. 2009. Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospermia at sexual maturity. *Reproduction*, 137, 487-95.
- FORD, C. E., JONES, K. W., POLANI, P. E., DE ALMEIDA, J. C. & BRIGGS, J. H. 1959. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*, 1, 711-3.
- FORMAN, B. M., TZAMELI, I., CHOI, H. S., CHEN, J., SIMHA, D., SEOL, W., EVANS, R. M. & MOORE, D. D. 1998. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature*, 395, 612-5.
- FOSTER, P. M. 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl*, 29, 140-7; discussion 181-5.
- FOSTER, P. M., MYLCHREEST, E., GAIDO, K. W. & SAR, M. 2001. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update*, 7, 231-5.
- FOWLER, P. A., BHATTACHARYA, S., GROMOLL, J., MONTEIRO, A. & O'SHAUGHNESSY, P. J. 2009. Maternal smoking and developmental changes in luteinizing hormone (LH) and the LH receptor in the fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 4688-95.
- FOWLER, P. A., EVANS, L. W., GROOME, N. P., TEMPLETON, A. & KNIGHT, P. G. 1998. A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. *Hum Reprod*, 13, 3530-6.
- FRANCAVILLA, S., CORDESCI, G., PROPERZI, G., CONCORDIA, N., CAPPAS, F. & POZZI, V. 1990. Ultrastructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 22, 389-400.

- FRANKE, F. E., PAULS, K., REY, R., MARKS, A., BERGMANN, M. & STEGER, K. 2004. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol (Berl)*, 209, 169-77.
- FREDERIKSEN, H., SKAKKEBAEK, N. E. & ANDERSSON, A. M. 2007. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*, 51, 899-911.
- FROMME, H., LAHRZ, T., PILOTY, M., GEBHART, H., ODDOY, A. & RUDEN, H. 2004. Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany). *Indoor Air*, 14, 188-95.
- FUJIMOTO, T., MIYAYAMA, Y. & FUYUTA, M. 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec*, 188, 315-30.
- FUKAMI, M., WADA, Y., MIYABAYASHI, K., NISHINO, I., HASEGAWA, T., NORDENSKJOLD, A., CAMERINO, G., KRETZ, C., BUJ-BELLO, A., LAPORTE, J., YAMADA, G., MOROHASHI, K. & OGATA, T. 2006. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat Genet*, 38, 1369-71.
- FUKUDA, T., HEDINGER, C. & GROSCURTH, P. 1975. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tissue Res*, 161, 55-70.

G

- GAIDO, K. W., HENSLEY, J. B., LIU, D., WALLACE, D. G., BORGHOFF, S., JOHNSON, K. J., HALL, S. J. & BOEKELHEIDE, K. 2007. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci*, 97, 491-503.
- GALLOWAY, T., CIPELLI, R., GURALNIK, J., FERRUCCI, L., BANDINELLI, S., CORSI, A. M., MONEY, C., MCCORMACK, P. & MELZER, D. 2010. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect*, 118, 1603-8.
- GASKELL, T. L., ESNAL, A., ROBINSON, L. L., ANDERSON, R. A. & SAUNDERS, P. T. 2004. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod*, 71, 2012-21.
- GASKELL, T. L., ROBINSON, L. L., GROOME, N. P., ANDERSON, R. A. & SAUNDERS, P. T. 2003. Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 424-32.
- GEORGE, F. W., CARR, B. R., NOBLE, J. F. & WILSON, J. D. 1987. 5 alpha-reduced androgens in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 64, 628-30.
- GIBSON, D. A. & SAUNDERS, P. T. 2012. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 348, 361-72.
- GILL, W. B., SCHUMACHER, G. F., BIBBO, M., STRAUS, F. H., 2ND & SCHOENBERG, H. W. 1979. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J Urol*, 122, 36-9.
- GIUSTI, R. M., IWAMOTO, K. & HATCH, E. E. 1995. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med*, 122, 778-88.
- GOMPERTS, M., WYLIE, C. & HEASMAN, J. 1994. Primordial germ cell migration. *Ciba Found Symp*, 182, 121-34; discussion 134-9.
- GOODWIN, B., GAUTHIER, K. C., UMETANI, M., WATSON, M. A., LOCHANSKY, M. I., COLLINS, J. L., LEITERSDORF, E., MANGELSDORF, D. J., KIEWER, S. A. & REPA, J. J. 2003. Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 223-8.
- GRAY, T. J. & BEAMAND, J. A. 1984. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem Toxicol*, 22, 123-31.
- GRECO, T. L., FURLOW, J. D., DUELLO, T. M. & GORSKI, J. 1992. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. *Endocrinology*, 130, 421-9.

- GREEN, S., KUMAR, V., KRUST, A., WALTER, P. & CHAMBON, P. 1986. Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 2, 751-8.
- GRIGNARD, E., LAPENNA, S. & BREMER, S. 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol In Vitro*, 26, 727-31.
- GRINSPON, R. P. & REY, R. A. 2010. Anti-mullerian hormone and sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Horm Res Paediatr*, 73, 81-92.
- GRISWOLD, S. L. & BEHRINGER, R. R. 2009. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev*, 3, 1-15.
- GUBBAY, J., COLLIGNON, J., KOOPMAN, P., CAPEL, B., ECONOMOU, A., MUNSTERBERG, A., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P. & LOVELL-BADGE, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 245-50.
- GUERQUIN, M. J., DUQUENNE, C., LAHAYE, J. B., TOURPIN, S., HABERT, R. & LIVERA, G. 2010. New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Dev Biol*, 346, 320-30.
- GUILLETTE, L. J., JR., GROSS, T. S., MASSON, G. R., MATTER, J. M., PERCIVAL, H. F. & WOODWARD, A. R. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*, 102, 680-8.
- GUILLETTE, L. J., JR. & GUILLETTE, E. A. 1996. Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? *Toxicol Ind Health*, 12, 537-50.
- GURNELL, M., SAVAGE, D. B., CHATTERJEE, V. K. & O'RAHILLY, S. 2003. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2412-21.

H

- HABER, D. A., BUCKLER, A. J., GLASER, T., CALL, K. M., PELLETIER, J., SOHN, R. L., DOUGLASS, E. C. & HOUSMAN, D. E. 1990. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*, 61, 1257-69.
- HABERT, R., LEJEUNE, H. & SAEZ, J. M. 2001. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 179, 47-74.
- HABERT, R., MUCZYNSKI, V., LEHRAIKI, A., LAMBROT, R., LECUREUIL, C., LEVACHER, C., COFFIGNY, H., PAIRAULT, C., MOISON, D., FRYDMAN, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2009. Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates. *Folia Histochem Cytobiol*, 47, S67-74.
- HABERT, R. & PICON, R. 1984. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem*, 21, 193-8.
- HADLEY, M. A., BYERS, S. W., SUAREZ-QUIAN, C. A., KLEINMAN, H. K. & DYM, M. 1985. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol*, 101, 1511-22.
- HANLEY, N. A., HAGAN, D. M., CLEMENT-JONES, M., BALL, S. G., STRACHAN, T., SALAS-CORTES, L., MCELREAVEY, K., LINDSAY, S., ROBSON, S., BULLEN, P., OSTRER, H. & WILSON, D. I. 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev*, 91, 403-7.
- HARKONEN, K., HUHTANIEMI, I., MAKINEN, J., HUBLER, D., IRJALA, K., KOSKENVUO, M., OETTEL, M., RAITAKARI, O., SAAD, F. & POLLANEN, P. 2003. The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men. *Int J Androl*, 26, 187-94.
- HARRIS, C. A., HENTTU, P., PARKER, M. G. & SUMPTER, J. P. 1997. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect*, 105, 802-11.

- HASE, T., YOSHIMURA, R., MITSUHASHI, M., SEGAWA, Y., KAWAHITO, Y., WADA, S., NAKATANI, T. & SANO, H. 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology*, 60, 542-7.
- HAUSER, R., DUTY, S., GODFREY-BAILEY, L. & CALAFAT, A. M. 2004. Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect*, 112, 751-3.
- HEANEY, J. D., ANDERSON, E. L., MICHELSON, M. V., ZECHEL, J. L., CONRAD, P. A., PAGE, D. C. & NADEAU, J. H. 2012. Germ cell pluripotency, premature differentiation and susceptibility to testicular teratomas in mice. *Development*, 139, 1577-86.
- HEINDEL, J. J. & POWELL, C. J. 1992. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol*, 115, 116-23.
- HELAL, M. A., MEHMET, H., THOMAS, N. S., COX, P. M., RALPH, D. J., BAJORIA, R. & CHATTERJEE, R. 2002. Ontogeny of human fetal testicular apoptosis during first, second, and third trimesters of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1189-93.
- HERBST, A. L., ULFELDER, H. & POSKANZER, D. C. 1971. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med*, 284, 878-81.
- HERING, R., FRADE-MARTINEZ, R., BAJANOWSKI, T., POETS, C. F., TSCHENTSCHER, F. & RIESS, O. 2006. Genetic investigation of the TSPYL1 gene in sudden infant death syndrome. *Genet Med*, 8, 55-8.
- HEUDORF, U., MERSCH-SUNDERMANN, V. & ANGERER, J. 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*, 210, 623-34.
- HILSCHER, W. & HILSCHER, B. 1976. Kinetics of the male gametogenesis. *Andrologia*, 8, 105-16.
- HINTON, R. H., MITCHELL, F. E., MANN, A., CHESCOE, D., PRICE, S. C., NUNN, A., GRASSO, P. & BRIDGES, J. W. 1986. Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid. *Environ Health Perspect*, 70, 195-210.
- HO, S. M., TANG, W. Y., BELMONTE DE FRAUSTO, J. & PRINS, G. S. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res*, 66, 5624-32.
- HOGBERG, J., HANBERG, A., BERGLUND, M., SKERFVING, S., REMBERGER, M., CALAFAT, A. M., FILIPSSON, A. F., JANSSON, B., JOHANSSON, N., APPELGREN, M. & HAKANSSON, H. 2008. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect*, 116, 334-9.
- HOLMES, L., JR., ESCALANTE, C., GARRISON, O., FOLDI, B. X., OGUNGBADE, G. O., ESSIEN, E. J. & WARD, D. 2008. Testicular cancer incidence trends in the USA (1975-2004): plateau or shifting racial paradigm? *Public Health*, 122, 862-72.
- HORSTMAN, K. A., NACIFF, J. M., OVERMANN, G. J., FOERTSCH, L. M., RICHARDSON, B. D. & DASTON, G. P. 2012. Effects of transplacental 17-alpha-ethynyl estradiol or bisphenol A on the developmental profile of steroidogenic acute regulatory protein in the rat testis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 95, 318-25.
- HOUSEKNECHT, K. L., COLE, B. M. & STEELE, P. J. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol*, 22, 1-23.
- HOWDESHELL, K. L., FURR, J., LAMBRIGHT, C. R., WILSON, V. S., RYAN, B. C. & GRAY, L. E., JR. 2008. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci*, 102, 371-82.
- HUANG, B., WANG, S., NING, Y., LAMB, A. N. & BARTLEY, J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet*, 87, 349-53.

- HUANG, P. C., KUO, P. L., CHOU, Y. Y., LIN, S. J. & LEE, C. C. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int*, 35, 14-20.
- HUANG, P. C., KUO, P. L., GUO, Y. L., LIAO, P. C. & LEE, C. C. 2007. Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod*, 22, 2715-22.
- HUHTANIEMI, I. & PELLINIEMI, L. J. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med*, 201, 125-40.
- HURST, C. H. & WAXMAN, D. J. 2003. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci*, 74, 297-308.
- HURST, C. H. & WAXMAN, D. J. 2004. Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199, 266-74.

I

- INOUE, H., YUKI, G., YOKOTA, H. & KATO, S. 2003. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos*, 31, 140-4.
- IRVINE, S., CAWOOD, E., RICHARDSON, D., MACDONALD, E. & AITKEN, J. 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ*, 312, 467-71.
- ITO, Y., NAKAMURA, T., YANAGIBA, Y., RAMDHAN, D. H., YAMAGISHI, N., NAITO, H., KAMIJIMA, M., GONZALEZ, F. J. & NAKAJIMA, T. 2012. Plasticizers May Activate Human Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Less Than That of a Mouse but May Activate Constitutive Androstane Receptor in Liver. *PPAR Res*, 2012, 201284.
- IVELL, R. & ANAND-IVELL, R. 2009. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Hum Reprod Update*, 15, 463-76.
- IVELL, R. & BATHGATE, R. A. 2002. Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod*, 67, 699-705.
- IVELL, R. & HARTUNG, S. 2003. The molecular basis of cryptorchidism. *Mol Hum Reprod*, 9, 175-81.

J

- JACOBS, P. A. & STRONG, J. A. 1959. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, 183, 302-3.
- JAMES-TODD, T., STAHLHUT, R., MEEKER, J. D., POWELL, S. G., HAUSER, R., HUANG, T. & RICH-EDWARDS, J. 2012. Urinary Phthalate Metabolite Concentrations and Diabetes among Women in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008. *Environ Health Perspect*, 120, 1307-13.
- JEFFERSON, W. N., COUSE, J. F., BANKS, E. P., KORACH, K. S. & NEWBOLD, R. R. 2000. Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biol Reprod*, 62, 310-7.
- JENKINS, S., WANG, J., ELTOUM, I., DESMOND, R. & LAMARTINIERE, C. A. 2011. Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. *Environ Health Perspect*, 119, 1604-9.
- JIRASEK, J. E. 1971a. Genital ducts and external genitalia: development and anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 7, 131-9.
- JIRASEK, J. E. 1971b. Testicular dysgenesis syndromes. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 7, 159-65.
- JOBLING, S., REYNOLDS, T., WHITE, R., PARKER, M. G. & SUMPTER, J. P. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect*, 103, 582-7.
- JOENSEN, U. N., FREDERIKSEN, H., JENSEN, M. B., LAURITSEN, M. P., OLESEN, I. A., LASSEN, T. H., ANDERSSON, A. M. & JORGENSEN, N. 2012. Phthalate excretion

- pattern and testicular function: a study of 881 healthy danish men. *Environ Health Perspect*, 120, 1397-403.
- JOHNSON, L., ZANE, R. S., PETTY, C. S. & NEAVES, W. B. 1984. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol Reprod*, 31, 785-95.
- JORGENSEN, N., RAJPERT-DE MEYTS, E., GRAEM, N., MULLER, J., GIWERCMAN, A. & SKAKKEBAEK, N. E. 1995. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest*, 72, 223-31.
- JOSSO, N., LAMARRE, I., PICARD, J. Y., BERTA, P., DAVIES, N., MORICHON, N., PESCHANSKI, M. & JENY, R. 1993. Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Hum Dev*, 33, 91-9.
- JOSSO, N., PICARD, J. Y., REY, R. & DI CLEMENTE, N. 2006. Testicular anti-Mullerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev*, 3, 347-58.

K

- KATO, H., FURUHASHI, T., TANAKA, M., KATSU, Y., WATANABE, H., OHTA, Y. & IGUCHI, T. 2006. Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod Toxicol*, 22, 20-9.
- KATOH-FUKUI, Y., OWAKI, A., TOYAMA, Y., KUSAKA, M., SHINOHARA, Y., MAEKAWA, M., TOSHIMORI, K. & MOROHASHI, K. 2005. Mouse Polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF1 expression. *Blood*, 106, 1612-20.
- KAVLOCK, R. J., DASTON, G. P., DEROSA, C., FENNER-CRISP, P., GRAY, L. E., KAATTARI, S., LUCIER, G., LUSTER, M., MAC, M. J., MACZKA, C., MILLER, R., MOORE, J., ROLLAND, R., SCOTT, G., SHEEHAN, D. M., SINKS, T. & TILSON, H. A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 4, 715-40.
- KIM, J. Y., HAN, E. H., KIM, H. G., OH, K. N., KIM, S. K., LEE, K. Y. & JEONG, H. G. 2010. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicol Lett*, 193, 200-8.
- KIM, Y. H., KIM, C. S., PARK, S., HAN, S. Y., PYO, M. Y. & YANG, M. 2003. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 441-8.
- KLEYMENOVA, E., SWANSON, C., BOEKELHEIDE, K. & GAIDO, K. W. 2005. Exposure in utero to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol Reprod*, 73, 482-90.
- KLIP, H., VERLOOP, J., VAN GOOL, J. D., KOSTER, M. E., BURGER, C. W. & VAN LEEUWEN, F. E. 2002. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet*, 359, 1102-7.
- KOBAYASHI, K., MIYAGAWA, M., WANG, R. S., SEKIGUCHI, S., SUDA, M. & HONMA, T. 2002. Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring. *Ind Health*, 40, 375-81.
- KOCH, H. M., BOLT, H. M. & ANGERER, J. 2004. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol*, 78, 123-30.
- KOCH, H. M., BOLT, H. M., PREUSS, R. & ANGERER, J. 2005a. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol*, 79, 367-76.
- KOCH, H. M., BOLT, H. M., PREUSS, R., ECKSTEIN, R., WEISBACH, V. & ANGERER, J. 2005b. Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol*, 79, 689-93.

- KOCH, H. M., PREUSS, R. & ANGERER, J. 2006. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl*, 29, 155-65; discussion 181-5.
- KOCH, H. M., ROSSBACH, B., DREXLER, H. & ANGERER, J. 2003. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res*, 93, 177-85.
- KOIKE, E., INOUE, K., YANAGISAWA, R. & TAKANO, H. 2009. Di-(2-ethylhexyl) phthalate affects immune cells from atopic prone mice in vitro. *Toxicology*, 259, 54-60.
- KOIKE, S., SAKAI, M. & MURAMATSU, M. 1987. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*, 15, 2499-513.
- KOO, H. J. & LEE, B. M. 2004. Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J Toxicol Environ Health A*, 67, 1901-14.
- KOOPMAN, P., GUBBAY, J., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P. & LOVELL-BADGE, R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351, 117-21.
- KOPP, A. 2012. Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet*, 28, 175-84.
- KOUBOVA, J., MENKE, D. B., ZHOU, Q., CAPEL, B., GRISWOLD, M. D. & PAGE, D. C. 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2474-9.
- KREIDBERG, J. A., SARIOLA, H., LORING, J. M., MAEDA, M., PELLETIER, J., HOUSMAN, D. & JAENISCH, R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74, 679-91.
- KREMER, H., KRAAIJ, R., TOLEDO, S. P., POST, M., FRIDMAN, J. B., HAYASHIDA, C. Y., VAN REEN, M., MILGROM, E., ROPERS, H. H., MARIMAN, E. & ET AL. 1995. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet*, 9, 160-4.
- KRENTZ, A. D., MURPHY, M. W., KIM, S., COOK, M. S., CAPEL, B., ZHU, R., MATIN, A., SARVER, A. L., PARKER, K. L., GRISWOLD, M. D., LOOIJENGA, L. H., BARDWELL, V. J. & ZARKOWER, D. 2009. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 22323-8.
- KRISTENSEN, D. M., SONNE, S. B., OTTESEN, A. M., PERRETT, R. M., NIELSEN, J. E., ALMSTRUP, K., SKAKKEBAEK, N. E., LEFFERS, H. & RAJPERT-DE MEYTS, E. 2008. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol*, 288, 111-8.
- KRUGER, T., LONG, M. & BONEFELD-JORGENSEN, E. C. 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology*, 246, 112-23.
- KUDO, T., KANEKO, M., IWASAKI, H., TOGAYACHI, A., NISHIHARA, S., ABE, K. & NARIMATSU, H. 2004. Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. *Mol Cell Biol*, 24, 4221-8.
- KUIPER, G. G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5925-30.
- KUIPER, G. G., LEMMEN, J. G., CARLSSON, B., CORTON, J. C., SAFE, S. H., VAN DER SAAG, P. T., VAN DER BURG, B. & GUSTAFSSON, J. A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252-63.
- KUREBAYASHI, H., BETSUI, H. & OHNO, Y. 2003. Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci*, 73, 17-25.

L

- LACROIX, M. Z., PUEL, S., COLLET, S. H., CORBEL, T., PICARD-HAGEN, N., TOUTAIN, P. L., VIGUIE, C. & GAYRARD, V. 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*, 85, 2053-9.
- LAGUE, E. & TREMBLAY, J. J. 2008. Antagonistic effects of testosterone and the endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate on INSL3 transcription in Leydig cells. *Endocrinology*, 149, 4688-94.
- LAKE, B. G., GANGOLLI, S. D., GRASSO, P. & LLOYD, A. G. 1975. Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 32, 355-67.
- LAMBROT, R., COFFIGNY, H., PAIRAULT, C., DONNADIEU, A. C., FRYDMAN, R., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2006a. Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 2696-703.
- LAMBROT, R., LIVERA, G., COFFIGNY, H., PAIRAULT, C., FRYDMAN, R., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2006b. A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie*, 88, 1831-5.
- LAMBROT, R., MUCZYNSKI, V., LECUREUIL, C., ANGENARD, G., COFFIGNY, H., PAIRAULT, C., MOISON, D., FRYDMAN, R., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2009. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect*, 117, 32-7.
- LAPINSKAS, P. J., BROWN, S., LEESNITZER, L. M., BLANCHARD, S., SWANSON, C., CATTLEY, R. C. & CORTON, J. C. 2005. Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*, 207, 149-63.
- LARSEN, S. T. & NIELSEN, G. D. 2008. Structure-activity relationship of immunostimulatory effects of phthalates. *BMC Immunol*, 9, 61.
- LASSURGUERE, J., LIVERA, G., HABERT, R. & JEGOU, B. 2003. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci*, 73, 160-9.
- LATINI, G., DE FELICE, C., PRESTA, G., DEL VECCHIO, A., PARIS, I., RUGGIERI, F. & MAZZEO, P. 2003. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect*, 111, 1783-5.
- LATINI, G., DEL VECCHIO, A., MASSARO, M., VERROTTI, A. & C, D. E. F. 2006. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr Med Chem*, 13, 2527-34.
- LEAV, I., HO, S. M., OFNER, P., MERK, F. B., KWAN, P. W. & DAMASSA, D. 1988. Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Natl Cancer Inst*, 80, 1045-53.
- LEE, H. J., CHATTOPADHYAY, S., GONG, E. Y., AHN, R. S. & LEE, K. 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci*, 75, 40-6.
- LEE, M. M., DONAHOE, P. K., HASEGAWA, T., SILVERMAN, B., CRIST, G. B., BEST, S., HASEGAWA, Y., NOTO, R. A., SCHOENFELD, D. & MACLAUGHLIN, D. T. 1996. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 571-6.
- LEE, S. S., PINEAU, T., DRAGO, J., LEE, E. J., OWENS, J. W., KROETZ, D. L., FERNANDEZ-SALGUERO, P. M., WESTPHAL, H. & GONZALEZ, F. J. 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 15, 3012-22.
- LEHMANN, J. M., MOORE, L. B., SMITH-OLIVER, T. A., WILKISON, W. O., WILLSON, T. M. & KLIEWER, S. A. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand

- for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 270, 12953-6.
- LEHRAIKI, A., RACINE, C., KRUST, A., HABERT, R. & LEVACHER, C. 2009. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci*, 111, 372-82.
- LI, D. K., ZHOU, Z., MIAO, M., HE, Y., WANG, J., FERBER, J., HERRINTON, L. J., GAO, E. & YUAN, W. 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril*, 95, 625-30 e1-4.
- LI, J., MA, M. & WANG, Z. 2010a. In vitro profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicol In Vitro*, 24, 201-7.
- LI, M. W., MRUK, D. D., LEE, W. M. & CHENG, C. Y. 2010b. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17998-8003.
- LI, Y. J., SONG, T. B., CAI, Y. Y., ZHOU, J. S., SONG, X., ZHAO, X. & WU, X. L. 2009. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci*, 108, 427-36.
- LIN, H., GE, R. S., CHEN, G. R., HU, G. X., DONG, L., LIAN, Q. Q., HARDY, D. O., SOTTAS, C. M., LI, X. K. & HARDY, M. P. 2008a. Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7218-22.
- LIN, L., FERRAZ-DE-SOUZA, B. & ACHERMANN, J. C. 2007. Genetic disorders involving adrenal development. *Endocr Dev*, 11, 36-46.
- LIN, L. C., WANG, S. L., CHANG, Y. C., HUANG, P. C., CHENG, J. T., SU, P. H. & LIAO, P. C. 2011a. Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. *Chemosphere*, 83, 1192-9.
- LIN, S., KU, H. Y., SU, P. H., CHEN, J. W., HUANG, P. C., ANGERER, J. & WANG, S. L. 2011b. Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. *Chemosphere*, 82, 947-55.
- LIN, Y., GILL, M. E., KOUBOVA, J. & PAGE, D. C. 2008b. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science*, 322, 1685-7.
- LIND, P. M., ZETHELIUS, B. & LIND, L. 2012. Circulating levels of phthalate metabolites are associated with prevalent diabetes in the elderly. *Diabetes Care*, 35, 1519-24.
- LIU, R., XING, L., KONG, D., JIANG, J., SHANG, L. & HAO, W. 2012. Bisphenol A inhibits proliferation and induces apoptosis in micromass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signaling pathways. *Food Chem Toxicol*, 52C, 76-82.
- LIVERA, G., DELBES, G., PAIRAULT, C., ROUILLER-FABRE, V. & HABERT, R. 2006. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res*, 324, 507-21.
- LOGANATHAN, S. N. & KANNAN, K. 2011. Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol*, 61, 68-73.
- LOVELL-BADGE, R. 1992. Testis determination: soft talk and kinky sex. *Curr Opin Genet Dev*, 2, 596-601.
- LOVELL-BADGE, R. 1993. Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 339, 159-64.
- LU, B. & BISHOP, C. E. 2003. Late onset of spermatogenesis and gain of fertility in POG-deficient mice indicate that POG is not necessary for the proliferation of spermatogonia. *Biol Reprod*, 69, 161-8.
- LUO, X., IKEDA, Y. & PARKER, K. L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 481-90.

M

- MACLEAN, G., LI, H., METZGER, D., CHAMBON, P. & PETKOVICH, M. 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology*, 148, 4560-7.
- MAGRE, S., AGELOPOULOU, R. & JOST, A. 1980. [Sertoli cells and organogenesis of the fetal testis (author's transl)]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 41, 531-7.
- MAGRE, S. & JOST, A. 1991. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microscop Tech*, 19, 172-88.
- MAHOOD, I. K., HALLMARK, N., MCKINNELL, C., WALKER, M., FISHER, J. S. & SHARPE, R. M. 2005. Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology*, 146, 613-23.
- MAIN, K. M., MORTENSEN, G. K., KALEVA, M. M., BOISEN, K. A., DAMGAARD, I. N., CHELLAKOOTY, M., SCHMIDT, I. M., SUOMI, A. M., VIRTANEN, H. E., PETERSEN, D. V., ANDERSSON, A. M., TOPPARI, J. & SKAKKEBAEK, N. E. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect*, 114, 270-6.
- MAIN, K. M., SKAKKEBAEK, N. E. & TOPPARI, J. 2009. Cryptorchidism as part of the testicular dysgenesis syndrome: the environmental connection. *Endocr Dev*, 14, 167-73.
- MARK, M., JACOBS, H., OULAD-ABDELGHANI, M., DENNEFELD, C., FERET, B., VERNET, N., CODREANU, C. A., CHAMBON, P. & GHYSELINCK, N. B. 2008. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci*, 121, 3233-42.
- MARTINEAU, J., NORDQVIST, K., TILMANN, C., LOVELL-BADGE, R. & CAPEL, B. 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*, 7, 958-68.
- MARTINEZ-ARGUELLES, D. B., CULTY, M., ZIRKIN, B. R. & PAPADOPOULOS, V. 2009. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. *Endocrinology*, 150, 5575-85.
- MATTHEWS, J. B., TWOMEY, K. & ZACHAREWSKI, T. R. 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*, 14, 149-57.
- MATTHIESSEN, P. & SUMPTER, J. P. 1998. Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. *EXS*, 86, 319-35.
- MAYMON, B. B., PAZ, G., YOGEV, L., HAUSER, R., SCHREIBER, L., BOTCHAN, A. & YAVETZ, H. 2000. [Immunohistochemical identification of testicular germ cells--preliminary report]. *Harefuah*, 139, 179-82, 247.
- MCGLYNN, K. A., DEVESA, S. S., SIGURDSON, A. J., BROWN, L. M., TSAO, L. & TARONE, R. E. 2003. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer*, 97, 63-70.
- MCKINNELL, C., MITCHELL, R. T., WALKER, M., MORRIS, K., KELNAR, C. J., WALLACE, W. H. & SHARPE, R. M. 2009. Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod*, 24, 2244-54.
- MEACHAM, L. R., WINN, K. J., CULLER, F. L. & PARKS, J. S. 1991. Double vagina, cardiac, pulmonary, and other genital malformations with 46,XY karyotype. *Am J Med Genet*, 41, 478-81.
- MEEKER, J. D., CALAFAT, A. M. & HAUSER, R. 2007. Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ Health Perspect*, 115, 1029-34.
- MEEKER, J. D., CALAFAT, A. M. & HAUSER, R. 2009. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *J Androl*, 30, 287-97.
- MENDIOLA, J., JORGENSEN, N., ANDERSSON, A. M., CALAFAT, A. M., SILVA, M. J., REDMON, J. B., SPARKS, A., DROBNIS, E. Z., WANG, C., LIU, F. & SWAN, S. H.

2011. Associations between urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormones in fertile men. *Int J Androl*, 34, 369-78.
- MENDIOLA, J., JORGENSEN, N., ANDERSSON, A. M., CALAFAT, A. M., YE, X., REDMON, J. B., DROBNIS, E. Z., WANG, C., SPARKS, A., THURSTON, S. W., LIU, F. & SWAN, S. H. 2010. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect*, 118, 1286-91.
- MENDIOLA, J., MEEKER, J. D., JORGENSEN, N., ANDERSSON, A. M., LIU, F., CALAFAT, A. M., REDMON, J. B., DROBNIS, E. Z., SPARKS, A. E., WANG, C., HAUSER, R. & SWAN, S. H. 2012. Urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: pooled analysis of fertile and infertile men. *J Androl*, 33, 488-98.
- MENDIS, S. H., MEACHEM, S. J., SARRAJ, M. A. & LOVELAND, K. L. 2011. Activin A balances Sertoli and germ cell proliferation in the fetal mouse testis. *Biol Reprod*, 84, 379-91.
- MENKE, D. B., KOUBOVA, J. & PAGE, D. C. 2003. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol*, 262, 303-12.
- MERCHANT-LARIOS, H., MORENO-MENDOZA, N. & BUEHR, M. 1993. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol*, 37, 407-15.
- MERLET, J., MOREAU, E., HABERT, R. & RACINE, C. 2007. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. *Cell Cycle*, 6, 2258-62.
- MIAO, M., YUAN, W., HE, Y., ZHOU, Z., WANG, J., GAO, E., LI, G. & LI, D. K. 2011. In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91, 867-72.
- MIFSUD, A., SIM, C. K., BOETTGER-TONG, H., MOREIRA, S., LAMB, D. J., LIPSHULTZ, L. I. & YONG, E. L. 2001. Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil Steril*, 75, 275-81.
- MIGRENNE, S., PAIRAULT, C., RACINE, C., LIVERA, G., GELOSO, A. & HABERT, R. 2001. Luteinizing hormone-dependent activity and luteinizing hormone-independent differentiation of rat fetal Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 172, 193-202.
- MILATINER, D., HALLE, D., HUERTA, M., MARGALIOTH, E. J., COHEN, Y., BEN-CHETRIT, A., GAL, M., MIMONI, T. & ELDAR-GEVA, T. 2004. Associations between androgen receptor CAG repeat length and sperm morphology. *Hum Reprod*, 19, 1426-30.
- MIYAMOTO, N., YOSHIDA, M., KURATANI, S., MATSUO, I. & AIZAWA, S. 1997. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*, 124, 1653-64.
- MONIOT, B., BERTA, P., SCHERER, G., SUDBECK, P. & POULAT, F. 2000. Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev*, 91, 323-5.
- MORICE, L., BENAÏTREAU, D., DIEUDONNE, M. N., MORVAN, C., SERAZIN, V., DE MAZANCOURT, P., PECQUERY, R. & DOS SANTOS, E. 2011. Antiproliferative and proapoptotic effects of bisphenol A on human trophoblastic JEG-3 cells. *Reprod Toxicol*, 32, 69-76.
- MUCZYNSKI, V., CRAVEDI, J. P., LEHRAIKI, A., LEVACHER, C., MOISON, D., LECUREUIL, C., MESSIAEN, S., PERDU, E., FRYDMAN, R., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2012a. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: In vitro and in vivo approaches. *Toxicol Appl Pharmacol*, 261, 97-104.
- MUCZYNSKI, V., LECUREUIL, C., MESSIAEN, S., GUERQUIN, M. J., N'TUMBA-BYN, T., MOISON, D., HODROJ, W., BENJELLOUN, H., BAIJER, J., LIVERA, G., FRYDMAN, R., BENACHI, A., HABERT, R. & ROUILLER-FABRE, V. 2012b. Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving LXRalpha in Human Fetal Testis and Ovary. *PLoS One*, 7, e48266.
- MUROYA, K., OKUYAMA, T., GOISHI, K., OGISO, Y., FUKUDA, S., KAMEYAMA, J., SATO, H., SUZUKI, Y., TERASAKI, H., GOMYO, H., WAKUI, K., FUKUSHIMA, Y. &

- OGATA, T. 2000. Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 3094-100.
- MURRAY, T. J., MAFFINI, M. V., UCCI, A. A., SONNENSCHIN, C. & SOTO, A. M. 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol*, 23, 383-90.
- MYLCHREEST, E., WALLACE, D. G., CATTLEY, R. C. & FOSTER, P. M. 2000. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci*, 55, 143-51.

N

- N'TUMBA-BYN, T., MOISON D., LACROIX M., LECUREUIL C., LESAGE L., PRUD'HOMME, S. M., POZZI-GAUDIN, S., FRYDMAN, R., BENACHI A., LIVERA G, ROUILLER-FABRE, R & HABERT R. 2012. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal Leydig cell function. *PLoS One*, in production.
- NAGEL, S. C., VOM SAAL, F. S., THAYER, K. A., DHAR, M. G., BOECHLER, M. & WELSHONS, W. V. 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*, 105, 70-6.
- NAKAMURA, D., YANAGIBA, Y., DUAN, Z., ITO, Y., OKAMURA, A., ASAEDA, N., TAGAWA, Y., LI, C., TAYA, K., ZHANG, S. Y., NAITO, H., RAMDHAN, D. H., KAMIJIMA, M. & NAKAJIMA, T. 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett*, 194, 16-25.
- NANJAPPA, M. K., SIMON, L. & AKINGBEMI, B. T. 2012. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol Reprod*, 86, 135, 1-12.
- NIELSEN, M., BJORNSDOTTIR, S., HOYER, P. E. & BYSKOV, A. G. 2000. Ontogeny of oestrogen receptor alpha in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. *J Reprod Fertil*, 118, 195-204.
- NIEMI, M., IKONEN, M. & HERVONEN, A. 1967. Histochemistry and fine structure of the interstitial tissue in the human foetal testis., London, Churchill.
- NISHIKAWA, M., IWANO, H., YANAGISAWA, R., KOIKE, N., INOUE, H. & YOKOTA, H. 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect*, 118, 1196-203.
- NISHIZAWA, H., IMANISHI, S. & MANABE, N. 2005. Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J Reprod Dev*, 51, 593-605.
- NORDKAP, L., JOENSEN, U. N., BLOMBERG JENSEN, M. & JORGENSEN, N. 2012. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol Cell Endocrinol*, 355, 221-30.

O

- O'CONNOR, J. C., FRAME, S. R. & LADICS, G. S. 2002. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci*, 69, 92-108.
- O'SHAUGHNESSY, P. J., BAKER, P. J. & JOHNSTON, H. 2006. The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. *Int J Androl*, 29, 90-5; discussion 105-8.
- O'SHAUGHNESSY, P. J., BAKER, P. J., MONTEIRO, A., CASSIE, S., BHATTACHARYA, S. & FOWLER, P. A. 2007. Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 4792-801.

- O'SHAUGHNESSY, P. J. & FOWLER, P. A. 2011. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction*, 141, 37-46.
- OGURA, Y., ISHII, K., KANDA, H., KANAI, M., ARIMA, K., WANG, Y. & SUGIMURA, Y. 2007. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation*, 75, 745-56.
- OHTA, K., YAMAMOTO, M., LIN, Y., HOGG, N., AKIYAMA, H., BEHRINGER, R. R. & YAMAZAKI, Y. 2012. Male differentiation of germ cells induced by embryonic age-specific Sertoli cells in mice. *Biol Reprod*, 86, 112.
- OKADA, A. & KAI, O. 2008. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl*, 10, 271-6.
- OKADA, H., TOKUNAGA, T., LIU, X., TAKAYANAGI, S., MATSUSHIMA, A. & SHIMOHIGASHI, Y. 2008. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect*, 116, 32-8.
- OLASO, R. & HABERT, R. 2000. Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *J Androl*, 21, 497-511.
- OLSEN, L., LAMPA, E., BIRKHOLZ, D. A., LIND, L. & LIND, P. M. 2012. Circulating levels of bisphenol A (BPA) and phthalates in an elderly population in Sweden, based on the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS). *Ecotoxicol Environ Saf*, 75, 242-8.
- ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L. & LAMPERTI, A. A. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122, 787-94.
- OSTRER, H., HUANG, H. Y., MASCH, R. J. & SHAPIRO, E. 2007. A cellular study of human testis development. *Sex Dev*, 1, 286-92.
- OULAD-ABDELGHANI, M., BOUILLET, P., DECIMO, D., GANSMULLER, A., HEYBERGER, S., DOLLE, P., BRONNER, S., LUTZ, Y. & CHAMBON, P. 1996. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol*, 135, 469-77.

P

- PAGE, B. D. & LACROIX, G. M. 1995. The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit Contam*, 12, 129-51.
- PALMER, J. R., HATCH, E. E., RAO, R. S., KAUFMAN, R. H., HERBST, A. L., NOLLER, K. L., TITUS-ERNSTOFF, L. & HOOVER, R. N. 2001. Infertility among women exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Am J Epidemiol*, 154, 316-21.
- PALMER, J. R., HERBST, A. L., NOLLER, K. L., BOGGS, D. A., TROISI, R., TITUS-ERNSTOFF, L., HATCH, E. E., WISE, L. A., STROHSNITTER, W. C. & HOOVER, R. N. 2009. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ Health*, 8, 37.
- PALMER, J. R., WISE, L. A., ROBBY, S. J., TITUS-ERNSTOFF, L., NOLLER, K. L., HERBST, A. L., TROISI, R. & HOOVER, R. N. 2005. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Epidemiology*, 16, 583-6.
- PALMER, M. S., SINCLAIR, A. H., BERTA, P., ELLIS, N. A., GOODFELLOW, P. N., ABBAS, N. E. & FELLOUS, M. 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*, 342, 937-9.
- PALMER, S. J. & BURGOYNE, P. S. 1991. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX---XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*, 112, 265-8.
- PARIS, F., BALAGUER, P., TEROUANNE, B., SERVANT, N., LACOSTE, C., CRAVEDI, J. P., NICOLAS, J. C. & SULTAN, C. 2002. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and

- 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, 193, 43-9.
- PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J. & PISANI, P. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 94, 153-6.
- PARKS, L. G., OSTBY, J. S., LAMBRIGHT, C. R., ABBOTT, B. D., KLINEFELTER, G. R., BARLOW, N. J. & GRAY, L. E., JR. 2000. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci*, 58, 339-49.
- PATHIRANA, I. N., KAWATE, N., BULLESBACH, E. E., TAKAHASHI, M., HATOYA, S., INABA, T. & TAMADA, H. 2012. Insulin-like peptide 3 stimulates testosterone secretion in mouse Leydig cells via cAMP pathway. *Regul Pept*, 178, 102-6.
- PAULOZZI, L. J., ERICKSON, J. D. & JACKSON, R. J. 1997. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics*, 100, 831-4.
- PAULS, K., SCHORLE, H., JESKE, W., BREHM, R., STEGER, K., WERNERT, N., BUTTNER, R. & ZHOU, H. 2006. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod*, 21, 397-404.
- PELLETIER, G. & EL-ALFY, M. 2000. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4835-40.
- PELLINIEMI, L. J. & NIEMI, M. 1969. Fine structure of the human foetal testis. I. The interstitial tissue. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 99, 507-22.
- PEREDA, J., ZORN, T. & SOTO-SUAZO, M. 2006. Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc Res Tech*, 69, 386-95.
- PERETZ, J., GUPTA, R. K., SINGH, J., HERNANDEZ-OCHOA, I. & FLAWS, J. A. 2011. Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol Sci*, 119, 209-17.
- PETERS, J. M., LEE, S. S., LI, W., WARD, J. M., GAVRILOVA, O., EVERETT, C., REITMAN, M. L., HUDSON, L. D. & GONZALEZ, F. J. 2000. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, 20, 5119-28.
- PETERSEN, C. & SODER, O. 2006. The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res*, 66, 153-61.
- PETERSEN, J. H. & BREINDAHL, T. 2000. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam*, 17, 133-41.
- PIERIK, F. H., BURDORF, A., NIJMAN, J. M., DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M., JUTTMANN, R. E. & WEBER, R. F. 2002. A high hypospadias rate in The Netherlands. *Hum Reprod*, 17, 1112-5.
- PIPREK, R. P. 2010. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol*, 54, 779-86.
- PITTMAN, D. L., COBB, J., SCHIMENTI, K. J., WILSON, L. A., COOPER, D. M., BRIGNULL, E., HANDEL, M. A. & SCHIMENTI, J. C. 1998. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell*, 1, 697-705.
- POTTENGER, L. H., DOMORADZKI, J. Y., MARKHAM, D. A., HANSEN, S. C., CAGEN, S. Z. & WAECHTER, J. M., JR. 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci*, 54, 3-18.
- PRINCE, F. P. 2001. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol*, 168, 213-6.
- PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 715-26.
- PUFFENBERGER, E. G., HU-LINCE, D., PAROD, J. M., CRAIG, D. W., DOBRIN, S. E., CONWAY, A. R., DONARUM, E. A., STRAUSS, K. A., DUNCKLEY, T., CARDENAS,

- J. F., MELMED, K. R., WRIGHT, C. A., LIANG, W., STAFFORD, P., FLYNN, C. R., MORTON, D. H. & STEPHAN, D. A. 2004. Mapping of sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) by a SNP genome scan and identification of TSPYL loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11689-94.
- PUPO, M., PISANO, A., LAPPANO, R., SANTOLLA, M. F., DE FRANCESCO, E. M., ABONANTE, S., ROSANO, C. & MAGGIOLINI, M. 2012. Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ Health Perspect*, 120, 1177-82.

R

- RABINOVICI, J. & JAFFE, R. B. 1990. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev*, 11, 532-57.
- RAJPERT-DE MEYTS, E. 2006. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*, 12, 303-23.
- RAJPERT-DE MEYTS, E. & HOEI-HANSEN, C. E. 2007. From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci*, 1120, 168-80.
- RAJPERT-DE MEYTS, E., JORGENSEN, N., BRONDUM-NIELSEN, K., MULLER, J. & SKAKKEBAEK, N. E. 1998. Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS*, 106, 198-204; discussion 204-6.
- RAJPERT-DE MEYTS, E., JORGENSEN, N., GRAEM, N., MULLER, J., CATE, R. L. & SKAKKEBAEK, N. E. 1999. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 3836-44.
- RAJPERT-DE MEYTS, E. & SKAKKEBAEK, N. E. 1994. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl*, 17, 85-92.
- RAYMOND, C. S., MURPHY, M. W., O'SULLIVAN, M. G., BARDWELL, V. J. & ZARKOWER, D. 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*, 14, 2587-95.
- REARDON, W., GIBBONS, R. J., WINTER, R. M. & BARAITSER, M. 1995. Male pseudohermaphroditism in sibs with the alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome. *Am J Med Genet*, 55, 285-7.
- REDDY, J. K., MOODY, D. E., AZARNOFF, D. L. & RAO, M. S. 1976. Di-(2-ethylhexyl)phthalate: an industrial plasticizer induces hypolipidemia and enhances hepatic catalase and carnitine acetyltransferase activities in rat and mice. *Life Sci*, 18, 941-5.
- REN, H., ALEKSUNES, L. M., WOOD, C., VALLANAT, B., GEORGE, M. H., KLAASSEN, C. D. & CORTON, J. C. 2010. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha--independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol Sci*, 113, 45-59.
- REY, R., LORDEREAU-RICHARD, I., CAREL, J. C., BARBET, P., CATE, R. L., ROGER, M., CHAUSSAIN, J. L. & JOSSO, N. 1993. Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 77, 1220-6.
- REYES, F., WINTER, J. & FAIMAN, C. 1989. Endocrinology of the fetal testis. *The testis*, Burger, H. et de Kretser, D. New York, Raven Press. 1: 119-142.
- REYES, F. I., WINTER, J. S. & FAIMAN, C. 1973. Studies on human sexual development. I. Fetal gonadal and adrenal sex steroids. *J Clin Endocrinol Metab*, 37, 74-8.
- RIBEIRO, C., URBATZKA, R., CASTRO, L. F., CARROLA, J., FONTAINHAS-FERNANDES, A., MONTEIRO, R. A., ROCHA, E. & ROCHA, M. J. 2012. In vitro exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis to estrogenic endocrine disrupting chemicals:

- mRNA expression of genes encoding steroidogenic enzymes. *Toxicol Mech Methods*, 22, 47-53.
- RICHIARDI, L., BELLOCCO, R., ADAMI, H. O., TORRANG, A., BARLOW, L., HAKULINEN, T., RAHU, M., STENGREVICS, A., STORM, H., TRETLI, S., KURTINAITIS, J., TYCZYNSKI, J. E. & AKRE, O. 2004. Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 2157-66.
- RIDER, C. V., FURR, J. R., WILSON, V. S. & GRAY, L. E., JR. 2010. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl*, 33, 443-62.
- RODRIGUEZ, E., MATHEW, S., MUKHERJEE, A. B., REUTER, V. E., BOSL, G. J. & CHAGANTI, R. S. 1992. Analysis of chromosome 12 aneuploidy in interphase cells from human male germ cell tumors by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 5, 21-9.
- ROLLAND, M., LE MOAL, J., WAGNER, V., ROYERE, D. & DE MOUZON, J. 2012. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod*.
- ROSS, A. J. & CAPEL, B. 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 19-25.
- ROUILLER-FABRE, V., LAMBROT, R., MUCZYNSKI, V., COFFIGNY, H., LECUREUIL, C., PAIRAULT, C., BAKALSKA, M., COURTOT, A. M., FRYDMAN, R. & HABERT, R. 2008. [Development and regulations of testicular functions in the human foetus]. *Gynecol Obstet Fertil*, 36, 898-907.
- RUSYN, I. & CORTON, J. C. 2012. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutat Res*, 750, 141-58.
- RUSYN, I., PETERS, J. M. & CUNNINGHAM, M. L. 2006. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol*, 36, 459-79.
- RYU, J. Y., WHANG, J., PARK, H., IM, J. Y., KIM, J., AHN, M. Y., LEE, J., KIM, H. S., LEE, B. M., YOO, S. D., KWACK, S. J., OH, J. H., PARK, K. L., HAN, S. Y. & KIM, S. H. 2007. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and ERK 1/2 activation in testis of Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A*, 70, 1296-303.

S

- SADEGHIAN, H., ANAND-IVELL, R., BALVERS, M., RELAN, V. & IVELL, R. 2005. Constitutive regulation of the *Ins13* gene in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 241, 10-20.
- SAILLENFAIT, A. M., ROUDOT, A. C., GALLISSOT, F. & SABATE, J. P. 2011a. Prenatal developmental toxicity studies on di-n-heptyl and di-n-octyl phthalates in Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol*, 32, 268-76.
- SAILLENFAIT, A. M., ROUDOT, A. C., GALLISSOT, F., SABATE, J. P. & CHAGNON, M. C. 2011b. Developmental toxic potential of di-n-propyl phthalate administered orally to rats. *J Appl Toxicol*, 31, 36-44.
- SAILLENFAIT, A. M., SABATE, J. P. & GALLISSOT, F. 2008. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol*, 26, 107-15.
- SAILLENFAIT, A. M., SABATE, J. P. & GALLISSOT, F. 2009. Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol*, 28, 468-76.
- SALAS-CORTES, L., JAUBERT, F., BARBAUX, S., NESSMANN, C., BONO, M. R., FELLOUS, M., MCELREAVEY, K. & ROSEMBLATT, M. 1999. The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol*, 43, 135-40.

- SALIAN, S., DOSHI, T. & VANAGE, G. 2009a. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, 265, 56-67.
- SALIAN, S., DOSHI, T. & VANAGE, G. 2009b. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci*, 85, 742-52.
- SAUNDERS, P. T., FISHER, J. S., SHARPE, R. M. & MILLAR, M. R. 1998. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol*, 156, R13-7.
- SAUNDERS, P. T., MILLAR, M. R., MACPHERSON, S., IRVINE, D. S., GROOME, N. P., EVANS, L. R., SHARPE, R. M. & SCOBIE, G. A. 2002. ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2706-15.
- SCARANO, W. R., TOLEDO, F. C., GUERRA, M. T., PINHEIRO, P. F., DOMENICONI, R. F., FELISBINO, S. L., CAMPOS, S. G., TABOGA, S. R. & KEMPINAS, W. G. 2010. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health A*, 73, 972-84.
- SCHERL, A., COUTE, Y., DEON, C., CALLE, A., KINDBEITER, K., SANCHEZ, J. C., GRECO, A., HOCHSTRASSER, D. & DIAZ, J. J. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell*, 13, 4100-9.
- SCHMAHL, J., EICHER, E. M., WASHBURN, L. L. & CAPEL, B. 2000. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*, 127, 65-73.
- SCHUBERT, S., KAMINO, K., BOHM, D., ADHAM, I., ENGEL, W., VON WASIELEWSKI, R., MOHARREGH-KHIABANI, D., MAUCERI, G., VASKE, B., MEINHARDT, A., SCHONER, A., GONZALEZ-FASSRAINER, D. & SCHMIDTKE, J. 2008. TSPY expression is variably altered in transgenic mice with testicular feminization. *Biol Reprod*, 79, 125-33.
- SCOTT, H. M., HUTCHISON, G. R., MAHOOD, I. K., HALLMARK, N., WELSH, M., DE GENDT, K., VERHOEVEN, G., O'SHAUGHNESSY, P. & SHARPE, R. M. 2007. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology*, 148, 2027-36.
- SCOTT, H. M., MASON, J. I. & SHARPE, R. M. 2009. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev*, 30, 883-925.
- SEKI, S., AOKI, M., HOSOKAWA, T., SAITO, T., MASUMA, R., KOMORI, M. & KURASAKI, M. 2011. Bisphenol-A suppresses neurite extension due to inhibition of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. *Chem Biol Interact*, 194, 23-30.
- SEKIDO, R., BAR, I., NARVAEZ, V., PENNY, G. & LOVELL-BADGE, R. 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*, 274, 271-9.
- SEKIDO, R. & LOVELL-BADGE, R. 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453, 930-4.
- SEKIDO, R. & LOVELL-BADGE, R. 2009. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet*, 25, 19-29.
- SHARPE, R. M. 2001. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett*, 120, 221-32.
- SHARPE, R. M. 2003. The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? *Int J Androl*, 26, 2-15.
- SHARPE, R. M. 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20, 91-110.
- SHARPE, R. M. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365, 1697-712.
- SHARPE, R. M., MCKINNELL, C., KIVLIN, C. & FISHER, J. S. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769-84.

- SHARPE, R. M. & SKAKKEBAEK, N. E. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341, 1392-5.
- SHARPE, R. M. & SKAKKEBAEK, N. E. 2008. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril*, 89, e33-8.
- SHARPE, R. M., TURNER, K. J., MCKINNEL, C., GROOME, N. P., ATANASSOVA, N., MILLAR, M. R., BUCHANAN, D. L. & COOKE, P. S. 1999. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *J Androl*, 20, 94-101.
- SHONO, T., SHIMA, Y., KONDO, T. & SUITA, S. 2005. In utero exposure to mono-n-butyl phthalate impairs insulin-like factor 3 gene expression and the transabdominal phase of testicular descent in fetal rats. *J Pediatr Surg*, 40, 1861-4.
- SILVA, M. J., BARR, D. B., REIDY, J. A., KATO, K., MALEK, N. A., HODGE, C. C., HURTZ, D., 3RD, CALAFAT, A. M., NEEDHAM, L. L. & BROCK, J. W. 2003. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol*, 77, 561-7.
- SKAKKEBAEK, N. E. 1972. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet*, 2, 516-7.
- SKAKKEBAEK, N. E., BERTHELSEN, J. G., GIWERCMAN, A. & MULLER, J. 1987. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*, 10, 19-28.
- SKAKKEBAEK, N. E., RAJPERT-DE MEYTS, E. & MAIN, K. M. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, 16, 972-8.
- SKINNER, M. K., MANIKKAM, M. & GUERRERO-BOSAGNA, C. 2010. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*, 21, 214-22.
- SKINNER, M. K., TUNG, P. S. & FRITZ, I. B. 1985. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol*, 100, 1941-7.
- SLAMA, R., JEGOU, B. & CORDIER, S. 2006. [Breakthroughs in the study of the influence of environmental factors on male reproductive health]. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 54, 167-74.
- SONNE, S. B., ALMSTRUP, K., DALGAARD, M., JUNCKER, A. S., EDSGARD, D., RUBAN, L., HARRISON, N. J., SCHWAGER, C., ABDOLLAHI, A., HUBER, P. E., BRUNAK, S., GJERDRUM, L. M., MOORE, H. D., ANDREWS, P. W., SKAKKEBAEK, N. E., RAJPERT-DE MEYTS, E. & LEFFERS, H. 2009. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res*, 69, 5241-50.
- SOUQUET, B., TOURPIN, S., MESSIAEN, S., MOISON, D., HABERT, R. & LIVERA, G. 2012. Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology*, 153, 2466-73.
- SPILLER, C., WILHELM, D. & KOOPMAN, P. 2009. Cell cycle analysis of fetal germ cells during sex differentiation in mice. *Biol Cell*, 101, 587-98.
- STAELS, B. & FRUCHART, J. C. 2005. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, 54, 2460-70.
- STEGER, K., REY, R., KLIESCH, S., LOUIS, F., SCHLEICHER, G. & BERGMANN, M. 1996. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl*, 19, 122-8.
- SUZUKI, A. & SAGA, Y. 2008. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev*, 22, 430-5.
- SWAN, S. H., ELKIN, E. P. & FENSTER, L. 2000. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect*, 108, 961-6.
- SWAN, S. H., MAIN, K. M., LIU, F., STEWART, S. L., KRUSE, R. L., CALAFAT, A. M., MAO, C. S., REDMON, J. B., TERNAND, C. L., SULLIVAN, S. & TEAGUE, J. L. 2005.

- Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect*, 113, 1056-61.
- SYLVESTER, S. R. & GRISWOLD, M. D. 1994. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J Androl*, 15, 381-5.

T

- TAKAYANAGI, S., TOKUNAGA, T., LIU, X., OKADA, H., MATSUSHIMA, A. & SHIMOHIGASHI, Y. 2006. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett*, 167, 95-105.
- TAKEDA, Y., LIU, X., SUMIYOSHI, M., MATSUSHIMA, A., SHIMOHIGASHI, M. & SHIMOHIGASHI, Y. 2009. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERRgamma isoform. *J Biochem*, 146, 113-22.
- TAKETO, T., LEE, C. H., ZHANG, J., LI, Y., LEE, C. Y. & LAU, Y. F. 2005. Expression of SRY proteins in both normal and sex-reversed XY fetal mouse gonads. *Dev Dyn*, 233, 612-22.
- TAKEUCHI, S., IIDA, M., KOBAYASHI, S., JIN, K., MATSUDA, T. & KOJIMA, H. 2005. Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology*, 210, 223-33.
- TAKEYAMA, J., SUZUKI, T., INOUE, S., KANEKO, C., NAGURA, H., HARADA, N. & SASANO, H. 2001. Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2258-62.
- TANAKA, M., NAKAYA, S., KATAYAMA, M., LEFFERS, H., NOZAWA, S., NAKAZAWA, R., IWAMOTO, T. & KOBAYASHI, S. 2006. Effect of prenatal exposure to bisphenol A on the serum testosterone concentration of rats at birth. *Hum Exp Toxicol*, 25, 369-73.
- TANG, H., BRENNAN, J., KARL, J., HAMADA, Y., RAETZMAN, L. & CAPEL, B. 2008. Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development*, 135, 3745-53.
- TAPANAINEN, J., KELLOKUMPU-LEHTINEN, P., PELLINIEMI, L. & HUHTANIEMI, I. 1981. Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 52, 98-102.
- TEDESCO, M., LA SALA, G., BARBAGALLO, F., DE FELICI, M. & FARINI, D. 2009. STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. *J Biol Chem*, 284, 35781-93.
- TEEGUARDEN, J. G., CALAFAT, A. M., YE, X., DOERGE, D. R., CHURCHWELL, M. I., GUNAWAN, R. & GRAHAM, M. K. 2011. Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol a during high-dietary exposure. *Toxicol Sci*, 123, 48-57.
- TESTA, C., NUTI, F., HAYEK, J., DE FELICE, C., CHELLI, M., ROVERO, P., LATINI, G. & PAPINI, A. M. 2012. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and autism spectrum disorders. *ASN Neuro*, 4, 223-9.
- THOMAS, J. A. & NORTHUP, S. J. 1982. Toxicity and metabolism of monoethylhexyl phthalate and diethylhexyl phthalate: a survey of recent literature. *J Toxicol Environ Health*, 9, 141-52.
- THOMAS, K., SUNG, D. Y., YANG, J., JOHNSON, K., THOMPSON, W., MILLETTE, C., MCCARREY, J., BREITBERG, A., GIBBS, R. & WALKER, W. 2005. Identification, characterization, and functional analysis of sp1 transcript variants expressed in germ cells during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod*, 72, 898-907.
- THOMAS, P. & DONG, J. 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102, 175-9.
- THUILLIER, R., MANKU, G., WANG, Y. & CULTY, M. 2009. Changes in MAPK pathway in neonatal and adult testis following fetal estrogen exposure and effects on rat testicular cells. *Microsc Res Tech*, 72, 773-86.

- TIAN, H., LI, Y., WANG, W., WU, P. & RU, S. 2012. Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies (*Poecilia reticulata*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 263, 163-70.
- TILMANN, C. & CAPEL, B. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*, 126, 2883-90.
- TINWELL, H., HASEMAN, J., LEFEVRE, P. A., WALLIS, N. & ASHBY, J. 2002. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci*, 68, 339-48.
- TOPPARI, J., KALEVA, M. & VIRTANEN, H. E. 2001. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update*, 7, 282-6.
- TOPPARI, J., LARSEN, J. C., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETTE, L. J., JR., JEGOU, B., JENSEN, T. K., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J. A., MEYER, O., MULLER, J., RAJPERT-DE MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J. & SKAKKEBAEK, N. E. 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 4, 741-803.
- TOPPARI, J., VIRTANEN, H. E., MAIN, K. M. & SKAKKEBAEK, N. E. 2010. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 88, 910-9.
- TRAN, D., PICARD, J. Y., CAMPARGUE, J. & JOSSO, N. 1987. Immunocytochemical detection of anti-mullerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. *J Histochem Cytochem*, 35, 733-43.
- TRAUTMANN, E., GUERQUIN, M. J., DUQUENNE, C., LAHAYE, J. B., HABERT, R. & LIVERA, G. 2008. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle*, 7, 656-64.
- TREMBLAY, G. B., KUNATH, T., BERGERON, D., LAPOINTE, L., CHAMPIGNY, C., BADER, J. A., ROSSANT, J. & GIGUERE, V. 2001. Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev*, 15, 833-8.
- TREMBLAY, J. J. & ROBERT, N. M. 2005. Role of nuclear receptors in INSL3 gene transcription in Leydig cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1061, 183-9.
- TRIPICIANO, A., FILIPPINI, A., BALLARINI, F. & PALOMBI, F. 1998. Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2alpha. *Mol Cell Endocrinol*, 138, 143-50.
- TYL, R. W., MYERS, C. B., MARR, M. C., FAIL, P. A., SEELY, J. C., BRINE, D. R., BARTER, R. A. & BUTALA, J. H. 2004. Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol*, 18, 241-64.
- TYL, R. W., MYERS, C. B., MARR, M. C., SLOAN, C. S., CASTILLO, N. P., VESELICA, M. M., SEELY, J. C., DIMOND, S. S., VAN MILLER, J. P., SHIOTSUKA, R. N., BEYER, D., HENTGES, S. G. & WAECHTER, J. M., JR. 2008. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci*, 104, 362-84.
- TYL, R. W., MYERS, C. B., MARR, M. C., THOMAS, B. F., KEIMOWITZ, A. R., BRINE, D. R., VESELICA, M. M., FAIL, P. A., CHANG, T. Y., SEELY, J. C., JOINER, R. L., BUTALA, J. H., DIMOND, S. S., CAGEN, S. Z., SHIOTSUKA, R. N., STROPP, G. D. & WAECHTER, J. M. 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 68, 121-46.

U

- UMEHARA, F., TATE, G., ITOH, K., YAMAGUCHI, N., DOUCHI, T., MITSUYA, T. & OSAME, M. 2000. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet*, 67, 1302-5.

UPMEIER, A., DEGEN, G. H., DIEL, P., MICHNA, H. & BOLT, H. M. 2000. Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch Toxicol*, 74, 431-6.

V

VALE, W., RIVIER, C., HSUEH, A., CAMPEN, C., MEUNIER, H., BICSAK, T., VAUGHAN, J., CORRIGAN, A., BARDIN, W., SAWCHENKO, P. & ET AL. 1988. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res*, 44, 1-34.

VAN PELT, A. M., DE ROOIJ, D. G., VAN DER BURG, B., VAN DER SAAG, P. T., GUSTAFSSON, J. A. & KUIPER, G. G. 1999. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology*, 140, 478-83.

VANDENBERG, L. N., CHAHOUD, I., HEINDEL, J. J., PADMANABHAN, V., PAUMGARTEN, F. J. & SCHOENFELDER, G. 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 118, 1055-70.

VANDENBERG, L. N., COLBORN, T., HAYES, T. B., HEINDEL, J. J., JACOBS, D. R., JR., LEE, D. H., SHIODA, T., SOTO, A. M., VOM SAAL, F. S., WELSHONS, W. V., ZOELLER, R. T. & MYERS, J. P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33, 378-455.

VANDENBERG, L. N., HAUSER, R., MARCUS, M., OLEA, N. & WELSHONS, W. V. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 24, 139-77.

VEITIA, R. A., SALAS-CORTES, L., OTTOLENGHI, C., PAILHOX, E., COTINOT, C. & FELLOUS, M. 2001. Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol*, 179, 3-16.

VERGOUWEN, R. P., JACOBS, S. G., HUISKAMP, R., DAVIDS, J. A. & DE ROOIJ, D. G. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil*, 93, 233-43.

VIERHAPPER, H., NOWOTNY, P. & WALDHAUSL, W. 2003. Reduced production rates of testosterone and dihydrotestosterone in healthy men treated with rosiglitazone. *Metabolism*, 52, 230-2.

VOGEL, T. & SCHMIDTKE, J. 1998. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet*, 80, 209-13.

VOLKEL, W., BITTNER, N. & DEKANT, W. 2005. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 33, 1748-57.

VOLKEL, W., COLNOT, T., CSANADY, G. A., FILSER, J. G. & DEKANT, W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 15, 1281-7.

VON ECKARDSTEIN, S., SYSKA, A., GROMOLL, J., KAMISCHKE, A., SIMONI, M. & NIESCHLAG, E. 2001. Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2585-90.

VOS, J. G., DYBING, E., GREIM, H. A., LADEFOGED, O., LAMBRE, C., TARAZONA, J. V., BRANDT, I. & VETHAAK, A. D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol*, 30, 71-133.

W

WAGNER, T., WIRTH, J., MEYER, J., ZABEL, B., HELD, M., ZIMMER, J., PASANTES, J., BRICARELLI, F. D., KEUTEL, J., HUSTERT, E., WOLF, U., TOMMERUP, N., SCHEMPP, W. & SCHERER, G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic

- dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, 79, 1111-20.
- WANG, W., CRAIG, Z. R., BASAVARAJAPPA, M. S., HAFNER, K. S. & FLAWS, J. A. 2012. Mono (2-ethylhexyl) Phthalate Induces Oxidative Stress and Inhibits Growth of Mouse Ovarian Antral Follicles. *Biol Reprod*.
- WARD, J. M., PETERS, J. M., PERELLA, C. M. & GONZALEZ, F. J. 1998. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol*, 26, 240-6.
- WARTENBERG, H. 1976. Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "Gonia". *Andrologia*, 8, 117-30.
- WARTENBERG, H. 1989. Differentiation and development of the testes. New York, Raven Press.
- WATANABE, S., WANG, R. S., MIYAGAWA, M., KOBAYASHI, K., SUDA, M., SEKIGUCHI, S. & HONMA, T. 2003. Imbalance of testosterone level in male offspring of rats perinatally exposed to bisphenol A. *Ind Health*, 41, 338-41.
- WAXMAN, D. J. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, 369, 11-23.
- WEIDNER, I. S., MOLLER, H., JENSEN, T. K. & SKAKKEBAEK, N. E. 1998. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect*, 106, 793-6.
- WELSH, M., SAUNDERS, P. T., FISKEN, M., SCOTT, H. M., HUTCHISON, G. R., SMITH, L. B. & SHARPE, R. M. 2008. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*, 118, 1479-90.
- WESTERN, P. S., MILES, D. C., VAN DEN BERGEN, J. A., BURTON, M. & SINCLAIR, A. H. 2008. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells*, 26, 339-47.
- WILHELM, D., PALMER, S. & KOOPMAN, P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*, 87, 1-28.
- WILLIAMS, K., MCKINNELL, C., SAUNDERS, P. T., WALKER, M., FISHER, J. S., TURNER, K. J., ATANASSOVA, N. & SHARPE, M. 2001. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update*, 7, 236-47.
- WILSON, V. S., HOWDESHELL, K. L., LAMBRIGHT, C. S., FURR, J. & EARL GRAY, L., JR. 2007. Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague-Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure. *Toxicol Lett*, 170, 177-84.
- WITTASSEK, M. & ANGERER, J. 2008. Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl*, 31, 131-8.
- WITTASSEK, M., WIESMULLER, G. A., KOCH, H. M., ECKARD, R., DOBLER, L., MULLER, J., ANGERER, J. & SCHLUTER, C. 2007. Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health*, 210, 319-33.
- WOHLFAHRT-VEJE, C., MAIN, K. M. & SKAKKEBAEK, N. E. 2009. Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 71, 459-65.
- WOLSTENHOLME, J. T., EDWARDS, M., SHETTY, S. R., GATEWOOD, J. D., TAYLOR, J. A., RISSMAN, E. F. & CONNELLY, J. J. 2012. Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology*, 153, 3828-38.
- WOOD, H. M. & ELDER, J. S. 2009. Cryptorchidism and testicular cancer: separating fact from fiction. *J Urol*, 181, 452-61.

- XI, W., LEE, C. K., YEUNG, W. S., GIESY, J. P., WONG, M. H., ZHANG, X., HECKER, M. & WONG, C. K. 2011. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol*, 31, 409-17.
- XIAO-FENG, Z., NAI-QIANG, Q., JING, Z., ZI, L. & YANG, Z. 2009. Di (n-butyl) phthalate inhibits testosterone synthesis through a glucocorticoid-mediated pathway in rats. *Int J Toxicol*, 28, 448-56.
- XIE, W., RADOMINSKA-PANDYA, A., SHI, Y., SIMON, C. M., NELSON, M. C., ONG, E. S., WAXMAN, D. J. & EVANS, R. M. 2001. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3375-80.
- XIE, Y., YANG, Q. & DEPIERRE, J. W. 2002. The effects of peroxisome proliferators on global lipid homeostasis and the possible significance of these effects to other responses to these xenobiotics: an hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*, 973, 17-25.
- XU, L. C., SUN, H., CHEN, J. F., BIAN, Q., QIAN, J., SONG, L. & WANG, X. R. 2005. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology*, 216, 197-203.

Y

- YANG, W. L. & FRUCHT, H. 2001. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 22, 1379-83.
- YAO, H. H., WHORISKEY, W. & CAPEL, B. 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev*, 16, 1433-40.
- YE, L., ZHAO, B., HU, G., CHU, Y. & GE, R. S. 2011. Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol Lett*, 207, 137-42.
- YE, X., KUKLENYIK, Z., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. 2005. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 383, 638-44.
- YOKOYAMA, Y., OKUBO, T., KANO, I., SATO, S. & KANO, K. 2003. Induction of apoptosis by mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) in U937 cells. *Toxicol Lett*, 144, 371-81.
- YOLTON, K., XU, Y., STRAUSS, D., ALTAYE, M., CALAFAT, A. M. & KHOURY, J. 2011. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicol Teratol*, 33, 558-66.

Z

- ZHANG, F. P., POUTANEN, M., WILBERTZ, J. & HUHTANIEMI, I. 2001. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol*, 15, 172-83.
- ZHANG, X. F., ZHANG, L. J., FENG, Y. N., CHEN, B., FENG, Y. M., LIANG, G. J., LI, L. & SHEN, W. 2012. Bisphenol A exposure modifies DNA methylation of imprint genes in mouse fetal germ cells. *Mol Biol Rep*, 39, 8621-8.
- ZHOU, Q., LI, Y., NIE, R., FRIEL, P., MITCHELL, D., EVANOFF, R. M., POUCHNIK, D., BANASIK, B., MCCARREY, J. R., SMALL, C. & GRISWOLD, M. D. 2008a. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol Reprod*, 78, 537-45.
- ZHOU, W., LIU, J., LIAO, L. & HAN, S. 2008b. Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 283, 12-8.

ANNEXES

ARTICLE COMPLEMENTAIRE n°1

“Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving LXR α in Human Fetal Testis and Ovary.”

Muczynski V, Lecureuil C, Messiaen S, Guerquin MJ, N'tumba-Byn T, Moison D, Hodroj W, Benjelloun H, Baijer J, Livera G, Frydman R, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V. PLoS One. 2012;7(10):e48266. doi: 10.1371/journal.pone.0048266. Epub 2012 Oct 30.

Cet article est une étude des effets cellulaires du MEHP sur le testicule fœtal humain. L'article est également focalisé sur les modifications des voies de métabolisation des lipides dans le testicule fœtal. J'ai participé aux expérimentations ainsi qu'à l'analyse des résultats concernant les modifications d'expression de gènes. Cependant, pour plus de clarté, j'ai choisi de ne pas développer cette étude dans mon manuscrit.

Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving *LXRα* in Human Fetal Testis and Ovary

Vincent Muczynski^{1,2,3}, Charlotte Lecureuil^{1,2,3}, Sébastien Messiaen^{1,2,3}, Marie-Justine Guerquin^{1,2,3}, Thierry N'Tumba-Byn^{1,2,3}, Delphine Moison^{1,2,3}, Wassim Hodroj^{1,2,3}, Hinde Benjelloun⁴, Jan Baijer⁴, Gabriel Livera^{1,2,3}, René Frydman⁵, Alexandra Benachi⁵, René Habert^{1,2,3}, Virginie Rouiller-Fabre^{1,2,3*}

1 University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Stem Cells and Radiation, Fontenay-aux-Roses, France, **2** CEA, DSV, IRCM, SCSR, LDG, 92265 Fontenay-aux-Roses, France, **3** INSERM, Unité 967, F-92265, Fontenay aux Roses, France, **4** Flow Cytometry Facility, CEA – DSV/IRCM/SCSR, F-92265 Fontenay aux Roses, France, **5** Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital A. Bécélère, Université Paris Sud, F-92141 Clamart, France

Abstract

Background: Phthalates have been shown to have reprotoxic effects in rodents and human during fetal life. Previous studies indicate that some members of the nuclear receptor (NR) superfamily potentially mediate phthalate effects. This study aimed to assess if expression of these nuclear receptors are modulated in the response to MEHP exposure on the human fetal gonads *in vitro*.

Methodology/Principal Findings: Testes and ovaries from 7 to 12 gestational weeks human fetuses were exposed to 10^{-4} M MEHP for 72 h *in vitro*. Transcriptional level of NRs and of downstream genes was then investigated using TLDA (TaqMan Low Density Array) and qPCR approaches. To determine whether somatic or germ cells of the testis are involved in the response to MEHP exposure, we developed a highly efficient cytometric germ cell sorting approach. *In vitro* exposure of fetal testes and ovaries to MEHP up-regulated the expression of *LXRα*, *SREBP* members and of downstream genes involved in the lipid and cholesterol synthesis in the whole gonad. In sorted testicular cells, this effect is only observable in somatic cells but not in the gonocytes. Moreover, the germ cell loss induced by MEHP exposure, that we previously described, is restricted to the male gonad as oogonia density is not affected *in vitro*.

Conclusions/Significance: We evidenced for the first time that phthalate increases the levels of mRNA for *LXRα*, and *SREBP* members potentially deregulating lipids/cholesterol synthesis in human fetal gonads. Interestingly, this novel effect is observable in both male and female whereas the germ cell apoptosis is restricted to the male gonad. Furthermore, we presented here a novel and potentially very useful flow cytometric cell sorting method to analyse molecular changes in germ cells versus somatic cells.

Citation: Muczynski V, Lecureuil C, Messiaen S, Guerquin M-J, N'Tumba-Byn T, et al. (2012) Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving *LXRα* in Human Fetal Testis and Ovary. PLoS ONE 7(10): e48266. doi:10.1371/journal.pone.0048266

Editor: Shree Ram Singh, National Cancer Institute, United States of America

Received: April 26, 2012; **Accepted:** September 21, 2012; **Published:** October 30, 2012

Copyright: © 2012 Muczynski et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Université Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, the Commissariat à l'Energie Atomique, INSERM, the Agence Nationale pour la Recherche (Phthalatestis grant 2008–2010) and Ministère de L'Ecologie et du Développement Durable (STORM grant, INERIS, 2010–2012). This work was also supported by funds from Région Ile-de-France. VM is supported by a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: virginie.rouiller-fabre@cea.fr

Introduction

Phthalic esters are compounds widely used as plasticizers. About 3 million tons of phthalic esters per year are produced world-wide and they can be found in many everyday products, such as PVCs, plastic bags, food packaging, cosmetics, industrial paints as well as blood transfusion packs [1,2,3]. Due to the non-covalent nature of their link with plastics, phthalates can easily leach from these products and, consequently, be ingested [4]. This is particularly worrying in pregnant women, since phthalates can reach the fetus. Indeed, the average level of Mono-EthylHexyl Phthalate (MEHP), the main active metabolite of Di-EthylHexyl Phthalate (DEHP), in cord blood is about 2×10^{-6} M [5,6] with maximal concentrations up to 10^{-5} M [5].

The toxic effects of phthalates on the development of the reproductive organs/functions have been widely described in rodent species. In the rat, *in utero* exposure (by force-feeding pregnant rats) to various phthalate ester subtypes has deleterious effects on testosterone production associated with abnormal aggregation of fetal Leydig cells [7,8,9,10,11,12]. These data have been confirmed also by using the *in vitro* method of organotypic culture of rat fetal gonads [13]. However, in the mouse, the effect of MEHP on testosterone secretion/production varies depending on the experimental conditions and the age of the testis explants [14]. Conversely, in the marmoset (*Callithrix jacchus*) no effects were observed following *in vivo* exposure to phthalates [15]. We have previously demonstrated that 72 h exposure to MEHP of the human fetal testis in culture has no effect on testosterone production or Leydig cell aggregation, but induces rapid germ

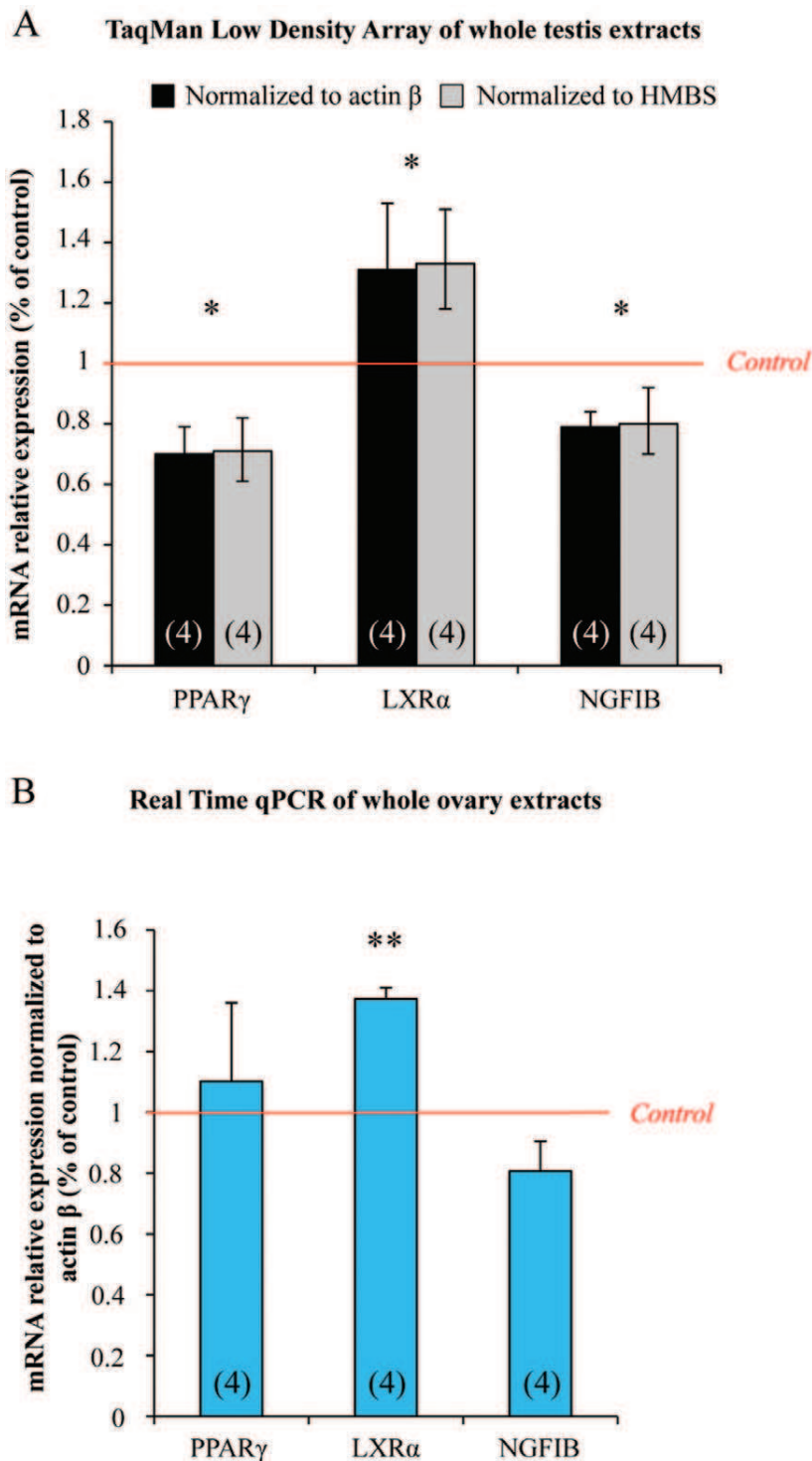


Figure 1. MEHP exposure affects the expression of nuclear receptors in human fetal testes and ovaries. Testes and ovaries from 7 to 12 week-old human fetuses were cultured with or without 10^{-4} M MEHP for 3 days and then mRNAs were isolated from whole gonad. (A), NRs superfamily TLDA plates were run with whole testis samples. Results were normalized to *actin β* or *HMBS* expression and the 3 differentially expressed NRs are shown as fold changes relative to the control values. Histograms represent the mean $\pm$ standard error of the results using 4 independent fetal testis cultures. (B), Transcriptional level of *PPAR γ* , *LXR α* and *NR4A1* was analyzed by real-time qPCR in fetal ovaries. Results were normalized to *Actin β* expression and are shown as fold changes relative to control values. Histograms represent the mean $\pm$ SEM of 4 different ovaries from different fetuses (as indicated in the respective column). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in paired t-tests recommended when comparing few samples. doi:10.1371/journal.pone.0048266.g001

cell loss in a dose-dependent (10^{-4} M and 10^{-5} M) manner [16,17]. In the same way, steroidogenesis is not affected by DBP exposure in human fetal testis xenograft model [18]. If the deleterious effect of phthalates on fetal Leydig cells seems to be restricted to the rat, the disruption of germ cell development during fetal life has been reported not only in human [16,17] but also in rat and mouse fetal testes both *in vivo* [19,20,21,22] and *in vitro* [13,14,23,24].

Beyond their well-described reprotoxic effects, phthalates are also suspected to interact with different members of the Nuclear Receptor (NR) superfamily or to act via their pathways by modulating expression of some nuclear receptors and their targets in various organ models. Recent studies have demonstrated that CAR (Constitutive Androstane Receptor) and its target genes are activated following DEHP exposure in mice and human hepatocytes [25]. Transcription of Pregnane X receptor (PXR) target

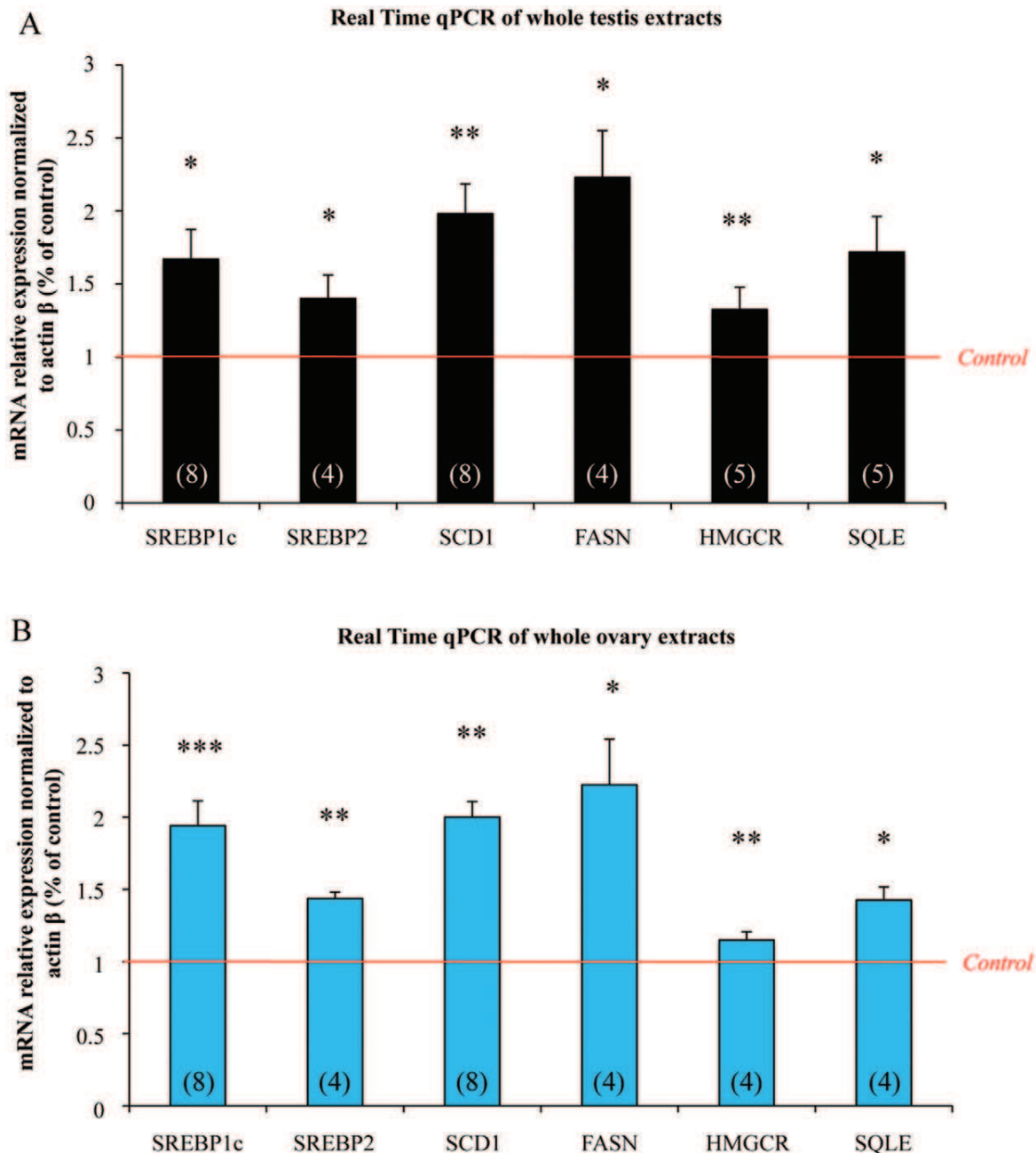


Figure 2. In human fetal gonads, exposure to MEHP significantly increases the mRNA expression of LXR α downstream genes involved in the cholesterol and lipid pathways. Ovaries and testes from 7 to 12 week-old human fetuses were cultured with or without 10^{-4} M MEHP for three days. mRNAs were isolated from whole gonads and the transcriptional level of LXR α downstream genes was analyzed by real-time qPCR in testes (A) and ovaries (B). Results were normalized to *Actin β* expression and are shown as fold changes relative to control values. Histograms represent the mean $\pm$ SEM of 4 to 8 different ovaries/testes from different fetuses (as indicated in the respective column). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in paired t-tests recommended when comparing few samples. doi:10.1371/journal.pone.0048266.g002

genes is also up-regulated upon MEHP exposure in a human hepatocarcinoma cell line [26]. Peroxisome-Proliferator Activated Receptor (PPAR) activation has been widely linked to the adverse effects of exposure to phthalates in adult mice [27]. Ward and collaborators reported that genetic ablation of PPAR α suppresses the hepatotoxic effect of DEHP in adult mice [28]. Moreover, models of *in vitro* transactivation assay demonstrated that MEHP is able to activate human and rodent PPAR α and PPAR γ isoforms [29]. However, in PPAR α knock-out mice, the deleterious effects of DEHP exposure on male genitalia were only partially blocked, suggesting that some toxicological effects of phthalate esters may be mediated also by other NRs [26,28]. In the rat or mouse fetal and neonatal testes, the expression of different NRs is also modulated in response to *in vivo* phthalate exposure. Indeed, for PPAR γ , both mRNA and protein expression are down-regulated [30,31]. Transcriptomic analyses also reported that *NGFIB* (NR4A1) and *NORI* (NR4A3), two orphan members of the NR superfamily, are up-regulated following phthalate exposure [21,32,33]. Furthermore, species-differences have been described. For instance, DEHP exposure induces PPAR α target genes in mice and rats, but not in marmosets [34]. Similarly, PPAR α -humanized mice have a different phenotypic response to DEHP treatment compared to wild type mice [35]. It is therefore essential to identify which NRs and downstream signaling pathways are modulated following exposure to phthalates in human fetal gonads.

In this study, we analyzed the transcriptional regulation of the different members of the NR superfamily and their downstream pathways in human male and female fetal gonads following exposure to MEHP in organotypic cultures. Since we previously showed that fetal germ cells are particularly affected by MEHP exposure in the human male gonad [16], we also developed a highly efficient cytometric cell sorting approach to determine in which cell population of the testis (somatic or germ cells) MEHP acts.

Materials and Methods

Ethic Statement

This study was approved by the Antoine Bécclère Hospital Ethics Committee as well as the French Agence de Biomedecine under the reference number PFS12-002. All women gave their written consent on a signed document stipulating that a scientific program will be carried out on their fetus.

Recovery of Human Fetal Gonads

Human fetal gonads were obtained from pregnant women referred to the Department of Obstetrics and Gynecology at the Antoine Bécclère Hospital, Clamart (France) for legally induced abortion in the first trimester of pregnancy (*i.e.* from the 7th until the 12th week post conception) as previously described [36,37]. We found gonads within the abortive material in approximately 50% to 60% of cases.

Organ Cultures

Human fetal gonads were cultured on Millicell-CM Biopore membranes (pore size 0.4 μ m, Millipore, Billerica, MA) as previously described [16,37]. The culture medium was phenol red-free Dulbecco modified Eagle medium/Ham F12 (1:1) (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 80 μ g/mL gentamicin (Sigma, St. Louis, MO). Each human gonad (ovary or testis) was cut into small pieces and three pieces from the same gonad were placed on a membrane floating on 320 μ L of culture medium in tissue culture dishes and cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂ [16,38]. The response to MEHP (TCI Europe; Antwerp, Belgium) was investigated by comparing explants from the same gonad cultured 4 days with the 3 last days in medium containing the solvent (DMSO, 1:4000, control) or MEHP (10⁻⁴ M). This dose was selected as we previously demonstrated that it produces strong deleterious effects without inducing toxicity in the testis [16]. Culture medium was changed every

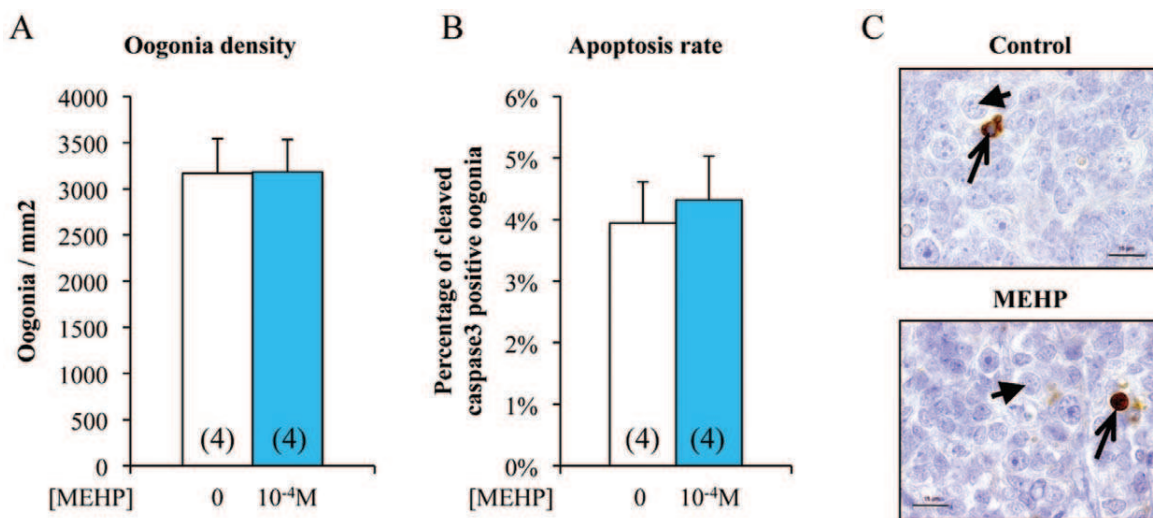


Figure 3. *In vitro* exposure to MEHP does not affect the number or apoptosis rate of germ cells in human fetal ovaries. Ovaries from 7 to 12 week-old human embryos were cultured with or without 10⁻⁴ M MEHP for three days. At the end of the culture period, they were fixed with Bouin's solution and stained with hematoxylin and eosin. Oogonia density (number of germ cells per mm² tissue) was measured based on the morphological analysis (A) and germ cell apoptosis rate (B) based on the expression of cleaved Caspase-3 (brown) (C). Histograms represent the mean $\pm$ SEM of four different ovaries from different fetuses (as indicated in the columns). Arrowheads indicate oogonia and arrows cleaved Caspase-3 positive oogonia. Bar, 15 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0048266.g003

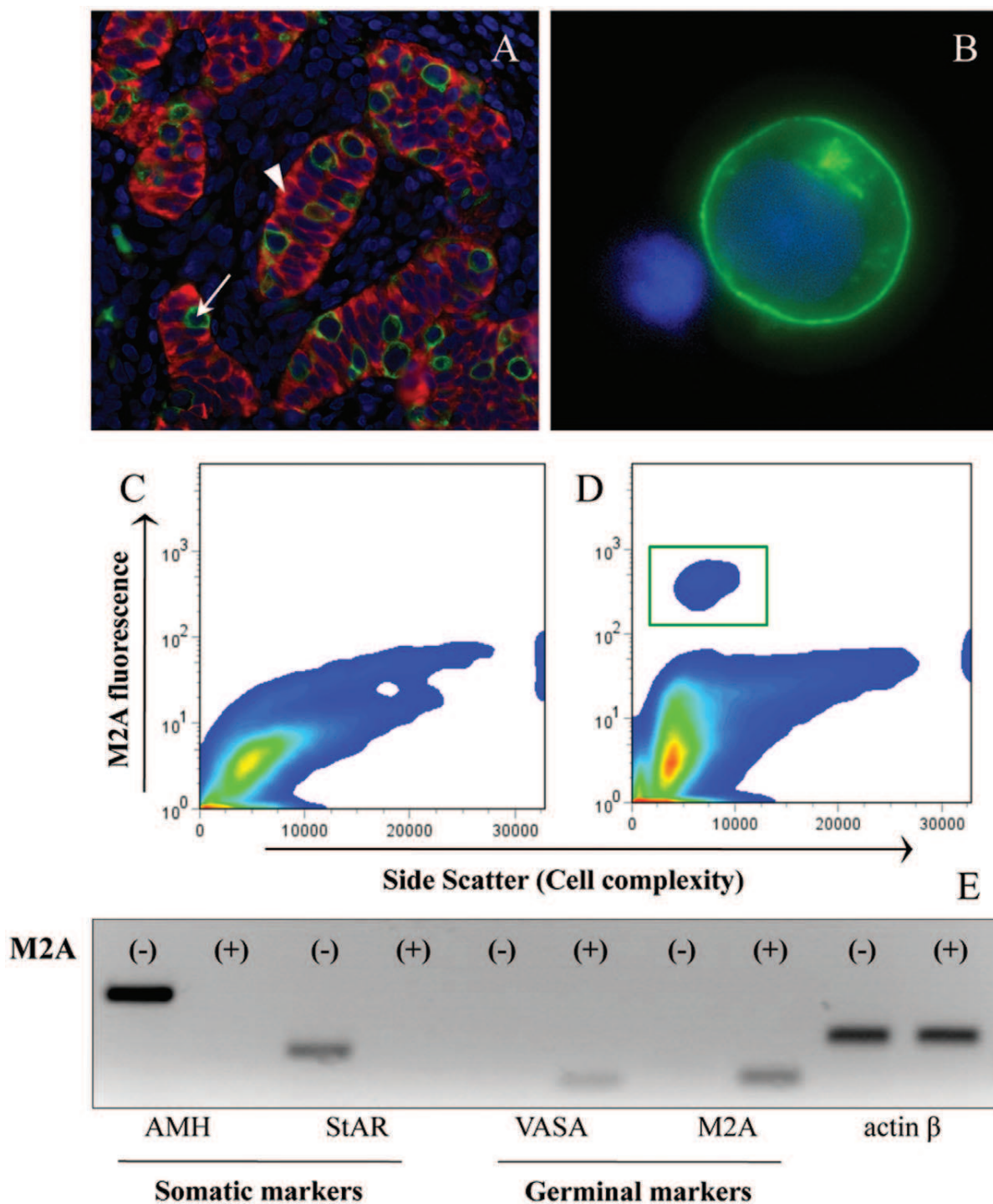


Figure 4. Isolation of M2A-positive and -negative cells from human fetal testes by flow cytometric cell sorting. Histological immunofluorescent staining for M2A (green) and AMH (red) in human fetal testis (A). M2A staining in living dissociated testicular cells (B). DNA was stained with DAPI (blue color in (A) and (B)). Cell sorting profiles of M2A fluorescence in fetal testicular cells incubated with isotype control (C) or anti-M2A antibody (D). The green square (D) represents the cell fraction sorted as M2A-positive. mRNA expression of different cell type markers in M2A-positive and -negative cell fractions (E). *AMH* and *StAR* are markers of Sertoli and Leydig cells, respectively, while *VASA* and *M2A* characterize the germ cell population. *Actin β* was used as control. White arrow indicates M2A positive cell, white arrowhead indicates AMH positive cell. doi:10.1371/journal.pone.0048266.g004

24 h. At the end of the culture period, all explants from the same gonad were placed in RLT buffer for RNA isolation with Qiagen kits or in collagenase/DNase solution for cell sorting. In

addition, some fetal ovary explants were fixed in Bouin's solution for 1 hour, dehydrated and embedded in paraffin.

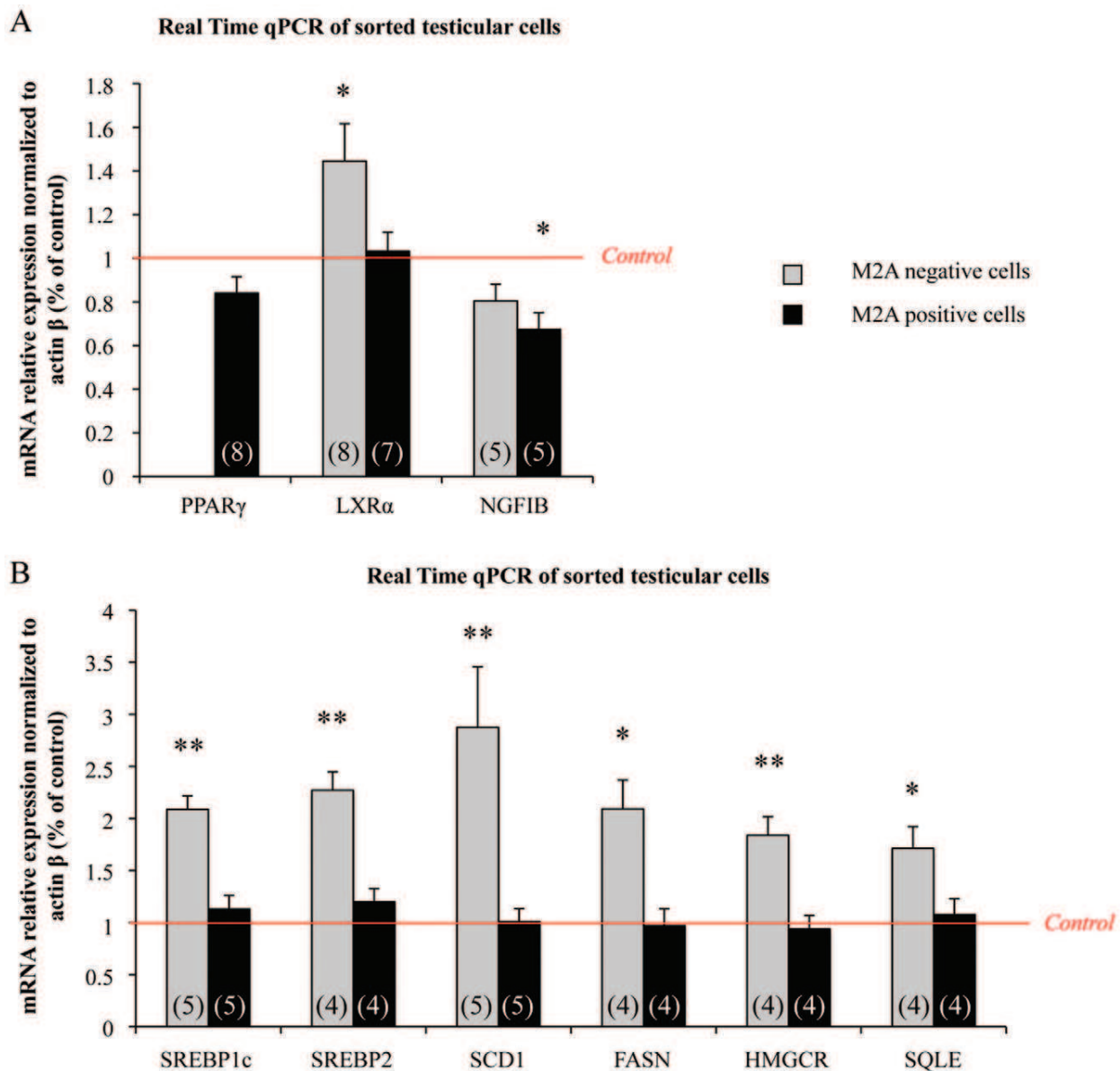


Figure 5. mRNA expression of *PPAR γ* , *LXR α* and *NR4A1* as well as of *LXR α* downstream genes in sorted germinal and somatic cells from fetal testes. Human fetal testes were treated, or not, with 10^{-4} M MEHP for 3 days in organotypic cultures. Testes were then dissociated and the M2A-positive and -negative cell fractions were sorted. The relative mRNA expression of *PPAR γ* , *LXR α* and *NR4A1* (A) as well as of *LXR α* downstream genes involved in cholesterol and lipid synthesis (B) was quantified in the M2A-positive and -negative cell populations by real-time qPCR. Results were normalized to *actin β* expression and are shown as fold changes relative to controls. The black columns represent M2A-positive cells and the grey columns the M2A-negative cells. The histograms are the mean $\pm$ SEM of 4 to 8 different testis from different fetuses (as indicated in the respective column). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in paired t-tests as recommended when comparing few samples. doi:10.1371/journal.pone.0048266.g005

Fetal Germ Cell Sorting

Testicular cell dissociation. At the end of the culture period, all the explants from the same testis were pooled and placed in PBS supplemented with 1% collagenase and 10% DNase. Cells were enzymatically dissociated under gentle shaking at 37.5°C for 5 min followed by repeated pipetting. Cells were then centrifuged (1200 rpm for 7 min) to remove the dissociation solution and resuspended in blocking solution (PBS/5% BSA) for 20 min.

M2A staining. Dissociated cells were centrifuged to discard the supernatant and incubated with a mouse anti-human M2A

monoclonal antibody (1:200 Ab77854, Abcam) at room temperature for 40 min. After three washes in PBS, cells were incubated with an Alexa-488 coupled rabbit anti-mouse antiserum (1:500, Invitrogen) for 20 min, then briefly washed and suspended in PBS with 2% BSA for cell sorting.

Cell sorting. Sorting was performed using a BD-InfluxTM biohazard system (BD Biosciences; San Jose, CA; USA). 2.5 ng/ml Propidium Iodide (Sigma-Aldrich) was added to each sample to exclude dead cells. Alexa-488 fluorescence was excited at 488 nm (200 mW) and fluorescent signals collected through a 520/40 bandpass filter. Two populations were identified and sorted: an

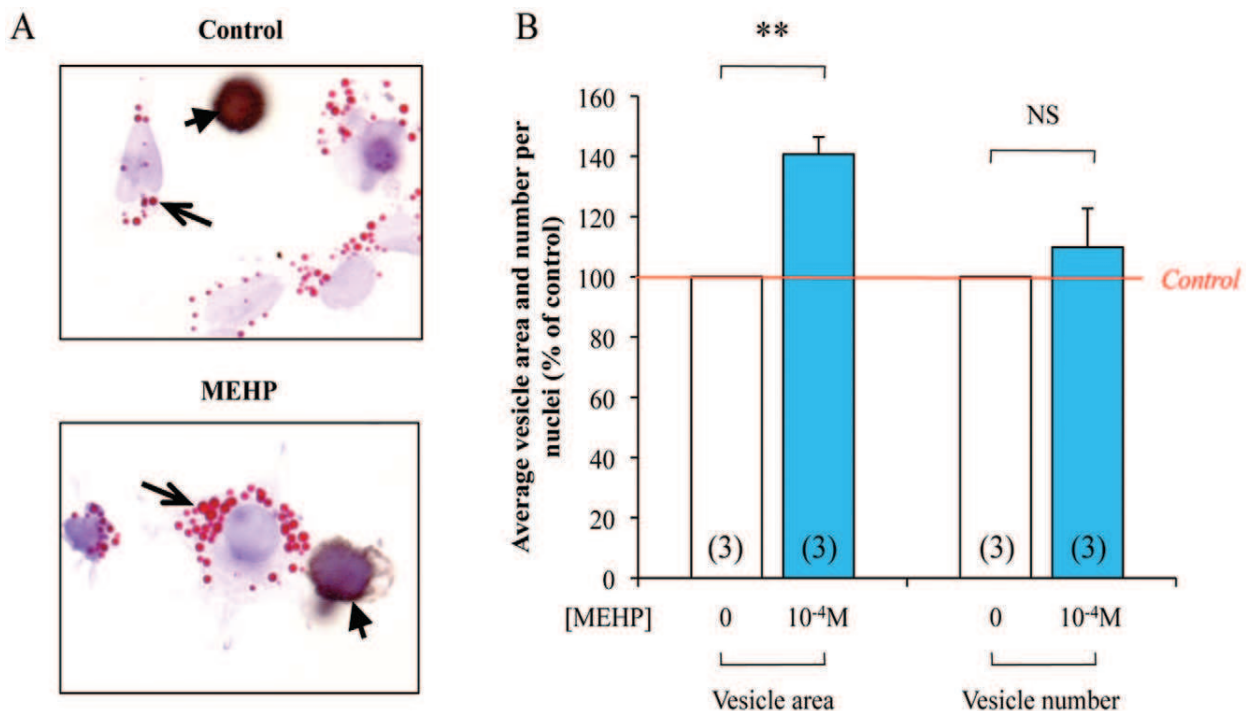


Figure 6. Quantification of lipid vesicle in dispersed testis cells following 72 h of 10^{-4} M MEHP exposure. Human fetal testes were treated, or not, with 10^{-4} M MEHP for 3 days in organotypic cultures. Testes were then dissociated and Oil Red O (Red, arrows) and M2A (Brown, arrowheads) staining were performed (A). In the somatic cells, quantification of lipid vesicle number per nuclei and average vesicle area was performed using Image J software (B). Control are set to 100% and treated are expressed in percentage of the control. The histograms are the mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments from different fetuses (as indicated in the respective column). NS = Not Significant, ** $p < 0.01$ in paired t-tests as recommended when comparing few samples.
doi:10.1371/journal.pone.0048266.g006

M2A-negative fraction (i.e., testicular somatic cells) and an M2A-positive fraction (germ cells). Cells were sorted directly in RLT buffer for RNA extraction and expression analyses.

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Total RNA was extracted using either the RNeasy Mini Kit (Qiagen) (ovary and testis explants) or the RNeasy Micro Kit (sorted testicular cells), both containing a DNase I digestion step to avoid genomic DNA contamination. RNAs were quantified using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer (Labtech, France). Each sample was then reverse transcribed by using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Courtabeuf, France). qPCR was carried out as previously described [16] using a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Each sample was run in duplicate and negative controls (without samples) were run for each primer combination. Every gene of interest was first standardized to the reference gene, and then the treated condition was represented in relative expression of the control. Primers are listed in Table S1.

TaqMan Low Density Array (TLDA)

TLDA plates (Applied Biosystems) designed for assessing the expression of the 48 known human NRs and 16 housekeeping genes were used. The geNorm software was used to determine the most appropriate control genes for our experimental conditions [39]. HydroxyMethylBilane Synthase (*HMBS*) and Actin beta (*Actin β*) were found to be the two more stable genes after MEHP treatment. For these experiments, 500 ng RNA were required for reverse transcription with the High Capacity cDNA Reverse

Transcription kit. The experiment was then performed according to manufacturer's instructions using the 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Each sample was run in triplicate.

Histological Analyses

Female germ cell counting. Serial gonad sections were deparaffinized, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin to count oogonia. The germ cell density was calculated by dividing the germ cell number by the area of the counted section as previously described [40]. All counts and measurements were carried out blind to the treatment and using the Histolab analysis software (Microvision Instruments, Evry, France).

Immunohistochemical analysis of cleaved Caspase-3 expression. Because caspase-3 is involved in most apoptotic pathways [41], we used its immuno-detection to quantify the rate of apoptosis. The primary anti-Cleaved Caspase-3 Asp 175 antibody (1:100, Cell Signaling, Beverly, MA) was detected using biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies in 5% Normal Goat Serum (NGS) and the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Peroxidase activity was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as substrate. For all immunohistochemical staining, negative controls were done by omitting the primary antibody.

Oil Red O Staining

At the end of the culture, testicular cells were dispersed as described (section *Fetal germ cell sorting/Testicular cell dissociation*). Dispersed cells were then resuspended in DMEM in 8 wells

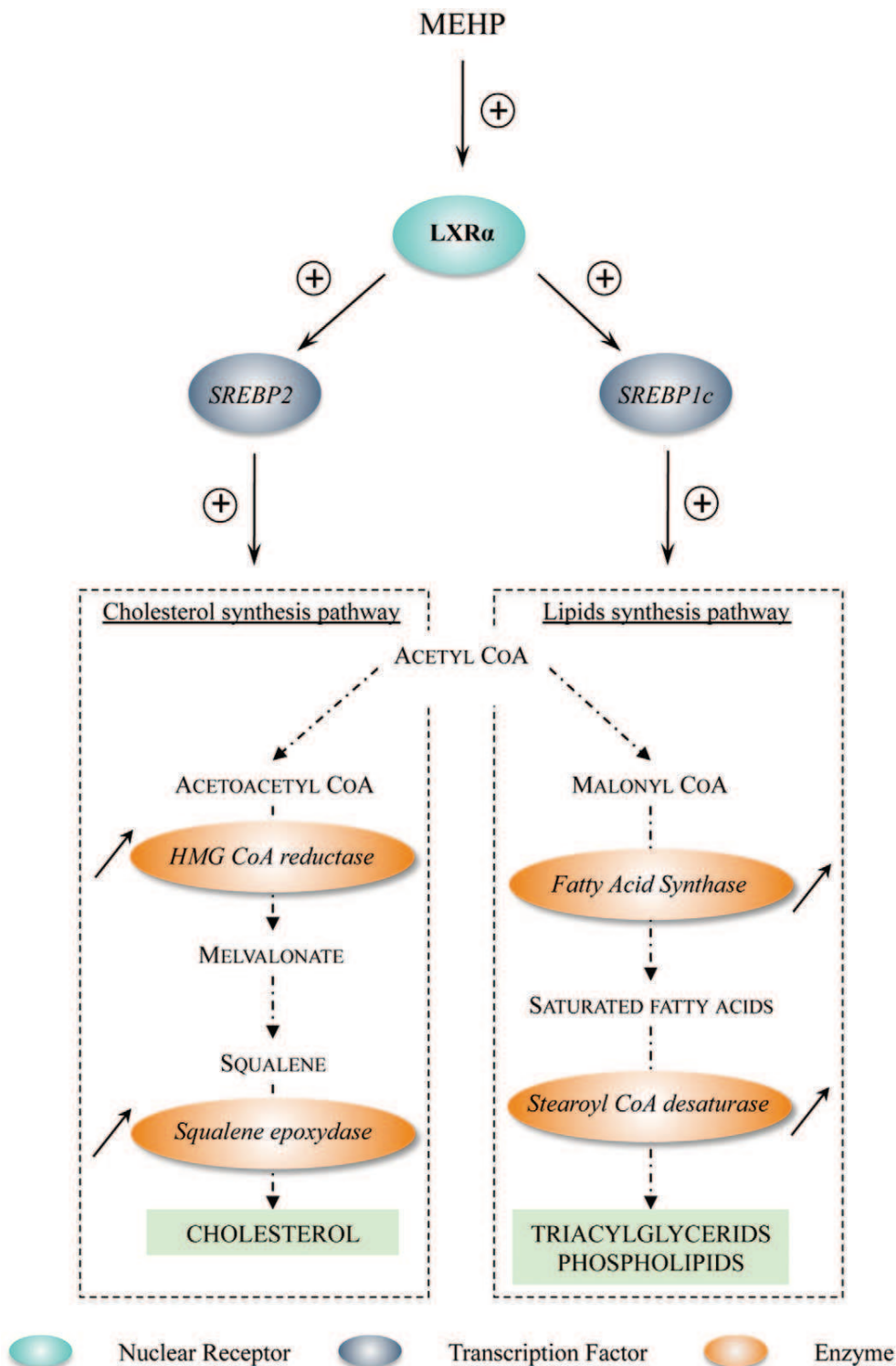


Figure 7. Working model of LXR α transcriptional up-regulation induced by MEHP exposure and effects on downstream genes involved in cholesterol/lipid synthesis. First, exposure to MEHP up-regulates LXR α expression. Increased LXR α activity then stimulates the mRNA expression of SREBP1c and SREBP2 that positively regulate, respectively, the transcriptional level of lipid and cholesterol synthesis enzymes, therefore potentially leading to an increase in cholesterol and lipid synthesis in cells. Adapted from [59]. doi:10.1371/journal.pone.0048266.g007

Labteck culture plates (Nunc, Denmark) and placed at 37°C for 5 h. The cells were fixed with 4% formaldehyde during 10 min at

room temperature. Cells were further stained using classical Oil Red O staining protocol, which shows the presence of triglyceride

deposits. M2A immunological staining was performed as previously described (section *Fetal germ cell sorting/M2A staining*) to visualize germ cells. Lipid vesicle number per nuclei and average area in the somatic cells were quantified using Image J software (Freeware under the general public license) with the particle detection plug-in.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean $\pm$ SEM. For all analyses, the significance of the differences between paired values of treated and untreated gonads was evaluated using the paired t-test as recommended for small-size samples.

Results

MEHP Modulates the mRNA Level of Members of the Nuclear Receptor Superfamily in Human Fetal Male and Female Gonads

To determine whether members of the nuclear receptor (NR) superfamily are transcriptionally modulated by phthalates in human fetal testis, we analyzed the mRNA expression of the 48 known human NRs using TLDA plates and mRNA from gonads cultured in control condition (DMSO) and after exposure to MEHP. In control condition, 41 of the 48 NRs were detected in each first trimester human fetal testis sample (Table S2).

Following *in vitro* exposure to 10^{-4} M MEHP for three days, changes in mRNA levels were found only for *PPAR γ* (NR1C3), *NGFIB* (NR4A1) and *LXR α* (NR1H3) (Figure 1A) and all the other 38 detected NRs were not modified (Table S2). The mRNA level of *PPAR γ* and *NGFIB* was significantly reduced by 30% and 20% respectively, whereas *LXR α* showed a 30% increase (Figure 1A).

To test if this transcriptional modulation is specific to the male gonad, we assessed whether *LXR α* , *PPAR γ* and *NGFIB* mRNA levels could also be affected by MEHP exposure in the human fetal ovary. Similarly to what observed in the testis, *LXR α* mRNA level was increased by 40% in treated ovaries in comparison to control samples (Figure 1B). Conversely, the transcriptional level of *PPAR γ* and *NGFIB* in ovaries was not modified by MEHP exposure (Figure 1B).

MEHP Exposure Modulates Downstream Genes of LXR α Both in Male and Female Gonads

As *LXR α* is the only NRs modulated similarly in fetal testis and ovary, we choose to analyze effect of MEHP on its downstream genes. *LXR α* is mainly a regulator of lipid and cholesterol homeostasis, we then investigated the effect of MEHP exposure on the expression of different transcription factors and enzymes involved in these two pathways using a qPCR approach. After a 72 h of 10^{-4} M MEHP exposure, genes involved in lipid metabolism, such as Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c (*SREBP1c*), which regulates the fatty acid pathways, and the downstream enzymes Stearoyl-CoA Desaturase 1 (*SCD1*) and Fatty-Acid Synthase (*FASN*) were up-regulated in human fetal testis (Figure 2A). Similarly, the expression of genes involved in cholesterol synthesis, such as Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (*SREBP2*), 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-CoA Reductase (*HMGCR*) and Squalene Epoxidase (*SQLE*), was increased by 1.4, 1.3 and 1.7 times respectively compared to the control (Figure 2A). Similar findings were observed as soon as 24 h of exposure (Data not shown).

In the same way, fetal ovaries presented an increased mRNA level of *SREBP1c* and *SREBP2* and of the downstream enzymes *SCD1*, *FASN*, *HMGCR* and *SQLE* (by 1.2 to 2.2 times in

comparison to controls) after 72 h of 10^{-4} M MEHP exposure (Figure 2B).

MEHP does not Affect Ovarian Germ Cell Development during the First Trimester of Pregnancy

We observed similar MEHP effects on transcriptional regulation of *LXR α* and downstream genes in both human fetal testis and ovary. As in the male gonad, MEHP exposure induces germ cell apoptosis leading to strong germ cell loss [16], we exposed fetal ovary explants to 10^{-4} M MEHP for three days and then assessed oogonia apoptosis. This exposure did not modify either the oogonia density (number of germ cells per mm² of tissue) (Figure 3A) or the rate of female germ cell apoptosis (4%) as determined by counting the number of cleaved Caspase 3 positive germ cells (Figure 3 B and C).

Use of M2A Staining in Cytometric Cell Sorting is a New Method to Isolate Human Gonocytes

As in the human testis, germ loss is a well-described effect of MEHP, we decided to identify which testicular cells are concerned by *LXR α* and downstream genes up-regulation. In this purpose, we developed a novel flow cytometric cell sorting approach based on the staining of M2A, a trans-membrane antigen that is expressed in 90 to 95% of germ cells during the first trimester of pregnancy [42].

First, using an immunohistological approach, we observed that M2A staining (green) was exclusively localized in the gonocytes characterized as large seminiferous cells that do not express anti-Müllerian hormone (AMH: a marker of Sertoli cells, in red), (Figure 4A). Dissociated testicular cells showed a population of large cells that were strongly M2A positive (green) with essentially no background staining in other cells (Figure 4B).

Secondly, the bivariate histogram of the Alexa-488 fluorescence (M2A) versus the side scatter (SSC) showed that the M2A-positive fraction was well separated from the M2A-negative population and therefore both populations were easily retrievable by cell sorting (Figures 4C and 4D). The purity of both populations was confirmed using RT-qPCR. Indeed, the M2A-positive fraction expressed only germ cell markers (*M2A* and *VASA*), whereas the M2A-negative fraction expressed exclusively Sertoli cell (*AMH*) and Leydig cell (Steroidogenic Acute Regulatory protein, *STAR*) markers (Figure 4E). This demonstrates that the M2A-positive and -negative cell populations are almost pure and that gonocytes are exclusively found in the M2A-positive fraction.

MEHP Modulates NRs Expression and LXR α Downstream Genes in Sorted Testicular Cells

M2A-positive and -negative populations were sorted from human fetal testes that had been exposed or not to 10^{-4} M MEHP for three days and the mRNA expression of the three NRs was analyzed in both fractions (Figure 5A). *PPAR γ* was detected only in M2A-positive cells and was not statistically modified in comparison to untreated controls. *NGFIB* expression was down-regulated in M2A-positive cells ($\sim$ 30% in comparison to untreated controls) and a trend to diminution was observed in M2A-negative cells. *LXR α* expression was significantly up-regulated following MEHP exposure in M2A-negative cells (45% increase), and unchanged in M2A-positive cells (Figure 5A).

As *LXR α* transcriptional up-regulation was restricted to somatic cells, we investigated whether *in vitro* exposure to MEHP affected the lipid and cholesterol synthesis pathways only in M2A-negative cells. Indeed, the six genes we found to be up-regulated in whole testes (Figure 2A) showed a 2- to 3-times significant increase only

in M2A- negative cells, whereas in M2A-positive cells their expression was comparable to that of untreated controls (Figure 5B).

Physiological Consequences of MEHP Exposure on Lipids Synthesis in the Testicular Somatic Cells

To test if the transcriptional regulation observed after MEHP exposure really affects lipid synthesis in the testicular somatic cells, we performed analyses of lipid vesicle number per nuclei and average area after MEHP exposure (10^{-4} M) during 72 h. Briefly, human testicular cells were dispersed and Oil Red O staining was performed to reveal the lipidic vesicles. Since MEHP effect on lipidic pathway was observed only in somatic cells, M2A immunological staining was performed to identify and exclude germ cells. Appearance of the lipidic vesicles is presented in figure 6A. The treatment with 10^{-4} M MEHP significantly increases the average vesicle area in the somatic cells without modifying the number of vesicle per nuclei (Figure 6B).

Discussion

The main purpose of this work was to broaden our knowledge regarding novel effects of phthalates exposure on human fetal gonads during pregnancy. Several studies have highlighted the potential involvement of different NR in the mediation of phthalate effects.

To realize this study, we set up a new protocol to sort for the first time human male fetal germ cells by a cytometric approach. This sorting strategy, using M2A antigen expressed in 90 to 95% of the germ cell population during the first trimester of pregnancy, will allow studies of human fetal male germ cells, a very important issue as the gonocytes are the precursors of the adult germ stem cells and are supposed to be the cells whom testicular cancer arise [43].

In order to determine to what extent NRs are involved in the testis response to phthalate exposure, we analyzed, using TLDA plates, the effect of a 3-day *in vitro* MEHP treatment on the mRNA expression of the 48 known NRs in human fetal testes. In basal conditions, Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II (*COUP-TFII*), a NR that is mainly expressed in Leydig cells and is involved in testosterone synthesis in mouse fetal testes [44], showed the highest expression. This result is not surprising as we used first-trimester human fetal testes, in which the production of testosterone and the number of Leydig cells rise to their maximum [45]. Interestingly, the Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner (*NR0B2*) that in mouse neonatal testis mediates the deleterious effects of DES, a well-known endocrine disruptor [46], was not detectable in human fetal testes (Table S2).

PPAR γ expression was significantly decreased in whole testes and we determined that its expression is restricted to the germ cell in male. Therefore, the observed decrease in *PPAR γ* mRNA probably reflects the loss of gonocytes induced by MEHP exposure in the cultured human testis [16]. Concerning the decrease in *NGFIB* mRNA expression, transcriptomic analyses performed in rodent fetal testes have revealed that *in vivo* exposure to different phthalates increases the mRNA expression of *NGFIB* and *NOR1*, [21,32,33]. On the contrary we observed here a decrease in the human fetal testis and in fetal germ cells, exhibiting here a new specificity of the human species.

We also demonstrated here that *LXR α* mRNA was up-regulated both in male and female fetal gonads. This is the first demonstration that *LXR α* mRNA expression is modulated by phthalate exposure. Indeed, *LXR α* was never incriminated in the

literature whatever the species or the tissues analyzed. Particularly, the global transcriptomic analyses performed using rat or mouse fetal testes after exposure to phthalates [21,33] failed to identify *LXR α* among the differentially expressed genes.

We then show that the cholesterol and lipid synthesis pathways, known to be regulated by *LXR α* through *SREBP* members [47,48] are also up-regulated in response to MEHP exposure in male human fetal gonads. Moreover, the increased expression of the lipid/cholesterol pathways is correlated to an increase in the total amount of lipids produced in the somatic cell of the human testis. This result fits with the well-known control of the *LXR* receptors over the lipid homeostasis. Indeed, in the literature, effects of phthalates modulating metabolic processes and particularly cholesterol and lipid synthesis have already been described. *In utero* DEHP exposure alters post-natal liver development in mice causing significant increased hepatosteatosis [49]. In the same way, it has already been reported that in adipocytes differentiated *in vitro* MEHP exposure increases the triglyceride contents [50].

A recent study described a decrease in the expression of *SREBP2* and downstream genes in fetal rat testis following *in utero* exposure to phthalates, resulting in reduced cholesterol level in whole testes [51]. The authors linked this result to the well-known effect of phthalates on testosterone production. Conversely, in our model of human fetal testis culture, such a link between cholesterol synthesis and testosterone secretion is not so obvious, as testosterone production was never modified by MEHP treatment [16]. This might reflect species-specific effects, as, in the same study, Johnson and collaborators reported that *in utero* exposure to phthalates in mice increased the expression of *SREBP2* and downstream genes without changes in testosterone production [51].

Despite this classical role, *LXRs* are also known to be involved in various physiological processes such as: glucose homeostasis, immunity and steroidogenesis [52]. *LXR* is also described to act in both female and male reproductive tissues [53,54]. In mice testis lacking *LXR α* , it has been evidenced a higher accumulation of the proapoptotic transcripts *Bad* and *TNF- α* associated with a higher number of apoptotic cells [55]. In the same way, *LXR*-deficient mice present abnormal epididymal features [53]. Lastly, *LXR α* controls the proliferation versus apoptosis balance in prostate cancer cells [53]. In the female side, *LXR α* modulates steroids synthesis in mice ovaries. In placenta, *LXR α* is known to regulate cholesterol transport and trophoblastic invasion [54]. It will be essential to further investigate if these *LXR*-related processes are altered in our model of human fetal gonads.

LXR α expression was increased in treated fetal ovaries. This not only demonstrates that human fetal ovary is sensitive to phthalate exposure, but also highlights a similar response to MEHP treatment in male and female human fetal gonads. On the other hand, the germ cells loss exclusively restricted to the male side suggests that some (but not all) phthalate effects are sex-specific [16]. This correlate with previous data demonstrating that human male and female germ cells can respond differently to external stress signals [56]. In the same way, *in utero* DEHP exposure in rat showed opposite effects on aldosterone levels in male and female at adulthood [57]. It could be interesting to analyze whether MEHP can have other effects on female gonads. A recent study shows that female adult mice treated with phthalate during their embryonic life have an elevated estradiol level and altered mRNA expression was found for the steroidogenic genes *Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor (LHCGR)*, *aromatase (CYP19A1)*, and *STAR* [58].

We evidenced that the lipid/cholesterol pathways is altered specifically in the somatic cell population of the human testes and

that germ cells loss is also exclusively restricted to the fetal testis. So far, we cannot conclude to an interaction between this altered lipid/cholesterol pathway in somatic cells and the germ cell loss we previously evidenced [16,17]. However, as somatic cells are known to impact germ cells proliferation and apoptosis, such a relation cannot be excluded and further investigation using LXR α antagonist or gene silencing technology will be required.

To conclude, this work evidences for the first time a novel effect of phthalate exposure involving up-regulation of LXR α and SREBP members mRNA that control both cholesterol and lipid synthesis (Figure 7). Thanks to our new cell sorting approach, we demonstrated that this effect is restricted to the somatic cells in the testis. Moreover, this up-regulation is observable in both human male and female fetal gonads in our *in vitro* culture system. However, these results do not establish which relevant physiological consequences this novel phthalate effect may trigger in the developing gonads.

Supporting Information

Table S1 List of the different TaqMan and SYBR primers used in qPCR along this study.

References

- Hauser R, Duty S, Godfrey-Bailey L, Calafat AM (2004) Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect* 112: 751–753.
- Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J (2007) Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health* 210: 623–634.
- Koo HJ, Lee BM (2004) Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J Toxicol Environ Health A* 67: 1901–1914.
- Kavlock R, Bockelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, et al. (2002) NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reprod Toxicol* 16: 489–527.
- Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, et al. (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 111: 1783–1785.
- Lin L, Zheng LX, Gu YP, Wang JY, Zhang YH, et al. (2008) [Levels of environmental endocrine disruptors in umbilical cord blood and maternal blood of low-birth-weight infants]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 42: 177–180.
- Culty M, Thuillier R, Li W, Wang Y, Martinez-Arguelles DB, et al. (2008) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod* 78: 1018–1028.
- Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM (2003) Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 18: 1383–1394.
- Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2004) Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 81: 60–68.
- Lin H, Ge RS, Chen GR, Hu GX, Dong L, et al. (2008) Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7218–7222.
- Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, Walker M, Fisher JS, et al. (2005) Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 146: 613–623.
- McKinnell C, Sharpe RM, Mahood K, Hallmark N, Scott H, et al. (2005) Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to di (n-butyl) phthalate. *Endocrinology* 146: 4536–4544.
- Chauvigne F, Menuet A, Lesne L, Chagnon MC, Chevrier C, et al. (2009) Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117: 515–521.
- Lehraiki A, Racine C, Krust A, Habert R, Levacher C (2009) Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 111: 372–382.
- McKinnell C, Mitchell RT, Walker M, Morris K, Kelnar CJ, et al. (2009) Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod* 24: 2244–2254.
- Lambrot R, Muczynski V, Lecureuil C, Angenard G, Cofignly H, et al. (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117: 32–37.

(DOCX)

Table S2 List of the nuclear receptors expressed in the human fetal testis. All mRNA expressions were normalized on Actin β . The lowest mean Δ Ct value refers to the highest expressed nuclear receptor. (DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to Aurélie Gouret for her skillful secretarial assistance. We would like to acknowledge N. Di Clemente (INSERM U782, Clamart, France) for donating the anti-AMH antibody. We thank the staff of the Department of Obstetrics and Gynecology of the Antoine Bécclère Hospital (Clamart, France). We are also grateful to Elisabetta Andermarcher for editing the English.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VM CL GL RH VRF. Performed the experiments: VM SM CL MJG TNT WH DM HB. Analyzed the data: VM CL VRF. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB RF AB. Wrote the paper: VM CL VRF.

- Muczynski V, Cravedi JP, Lehraiki A, Levacher C, Moison D, et al. (2012) Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: In vitro and in vivo approaches. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Mitchell RT, Childs AJ, Anderson RA, van den Driesche S, Saunders PT, et al. (2012) Do Phthalates Affect Steroidogenesis by the Human Fetal Testis? Exposure of Human Fetal Testis Xenografts to Di-n-Butyl Phthalate. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E341–348.
- Bockelheide K, Kleymanova E, Liu K, Swanson C, Gaido KW (2009) Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc Res Tech* 72: 629–638.
- Ferrara D, Hallmark N, Scott H, Brown R, McKinnell C, et al. (2006) Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 147: 5352–5362.
- Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, et al. (2007) Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 97: 491–503.
- Kleymanova E, Swanson C, Bockelheide K, Gaido KW (2005) Exposure in utero to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol Reprod* 73: 482–490.
- Li H, Kim KH (2003) Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod* 69: 1964–1972.
- Li LH, Jester WF, Jr., Orth JM (1998) Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 153: 258–265.
- Eveillard A, Mselli-Lakhal L, Mogha A, Lasserre F, Polizzi A, et al. (2009) Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol* 77: 1735–1746.
- Hurst CH, Waxman DJ (2004) Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 266–274.
- Latini G, Scoditti E, Verrotti A, De Felice C, Massaro M (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors as mediators of phthalate-induced effects in the male and female reproductive tract: epidemiological and experimental evidence. *PPAR Res* 2008: 359267.
- Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez EJ (1998) Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol* 26: 240–246.
- Maloney EK, Waxman DJ (1999) trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 161: 209–218.
- Boberg J, Metzdriff S, Wortzger R, Axelstad M, Brokken L, et al. (2008) Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 250: 75–81.
- Borch J, Metzdriff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard M (2006) Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 223: 144–155.
- Johnson KJ, Hensley JB, Kelso MD, Wallace DG, Gaido KW (2007) Mapping gene expression changes in the fetal rat testis following acute dibutyl phthalate

- exposure defines a complex temporal cascade of responding cell types. *Biol Reprod* 77: 978–989.
33. Liu K, Lehmann KP, Sar M, Young SS, Gaido KW (2005) Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod* 73: 180–192.
 34. Ito Y, Yamanoshita O, Kurata Y, Kamijima M, Aoyama T, et al. (2007) Induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-related enzymes by di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) treatment in mice and rats, but not marmosets. *Arch Toxicol* 81: 219–226.
 35. Feige JN, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, et al. (2010) The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 118: 234–241.
 36. Angenard G, Muczynski V, Coffigny H, Pairault C, Duquenne C, et al. (2010) Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. *Environ Health Perspect* 118: 331–337.
 37. Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, Donnadieu AC, Frydman R, et al. (2006) Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2696–2703.
 38. Le Bouffant R, Guerquin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, et al. (2010) Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 25: 2579–2590.
 39. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
 40. Guerquin MJ, Duquenne C, Lahaye JB, Tourpin S, Habert R, et al. (2010) New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Dev Biol* 346: 320–330.
 41. Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, et al. (2003) Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* 144: 648–661.
 42. Pauls K, Schorle H, Jeske W, Brehm R, Steger K, et al. (2006) Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 21: 397–404.
 43. Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, et al. (2009) Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* 69: 5241–5250.
 44. Qin J, Tsai MJ, Tsai SY (2008) Essential roles of COUP-TFII in Leydig cell differentiation and male fertility. *PLoS One* 3: e3285.
 45. O'Shaughnessy PJ, Fowler PA (2011) Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 141: 37–46.
 46. Volle DH, Decourteix M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, et al. (2009) The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 119: 3752–3764.
 47. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, et al. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693–704.
 48. Steffensen KR, Gustafsson JA (2004) Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 53 Suppl 1: S36–42.
 49. Maranghi F, Lorenzetti S, Tassinari R, Moracci G, Tassinari V, et al. (2010) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects liver morphology and metabolism in post-natal CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 29: 427–432.
 50. Ellero-Simatos S, Claus SP, Benelli C, Forest C, Letourneur F, et al. (2011) Combined transcriptomic-(1)H NMR metabolomic study reveals that mono-ethylhexyl phthalate stimulates adipogenesis and glyceroneogenesis in human adipocytes. *J Proteome Res* 10: 5493–5502.
 51. Johnson KJ, McDowell EN, Viereck MP, Xia JQ (2011) Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci* 120: 460–474.
 52. Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, et al. (2011) Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15: 219–232.
 53. El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, et al. (2011) Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta* 1812: 974–981.
 54. Mouzat K, Baron S, Marceau G, Caira F, Sapin V, et al. (2012) Emerging roles for LXRs and LXR-1 in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol*.
 55. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeck B, Dechelotte P, et al. (2007) Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21: 1014–1027.
 56. Guerquin MJ, Duquenne C, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Lambrot R, et al. (2009) Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. *Hum Reprod* 24: 670–678.
 57. Martinez-Arguelles DB, Guichard T, Culty M, Zirkin BR, Papadopoulos V (2011) In utero exposure to the antiandrogen di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases adrenal aldosterone production in the adult rat. *Biol Reprod* 85: 51–61.
 58. Moyer B, Hixon ML (2012) Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). *Reprod Toxicol*.
 59. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125–1131.

ARTICLE COMPLEMENTAIRE n°2

“Dexamethasone induces germ cell apoptosis in the human fetal ovary.”

Poulain M, Frydman N, Duquenne C, N'Tumba-Byn T, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V, Livera G. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Oct;97(10):E1890-7. doi: 10.1210/jc.2012-1681. Epub 2012 Jul 16.

Cet article est consacré à l'étude des effets de la dexaméthasone, glucocorticoïde de synthèse, sur l'ovaire fœtal humain. J'ai participé aux prélèvements et à la mise en culture des ovaires fœtaux humains.

Dexamethasone Induces Germ Cell Apoptosis in the Human Fetal Ovary

Marine Poulain, Nelly Frydman, Clotilde Duquenne, Thierry N'Tumba-Byn, Alexandra Benachi, René Habert, Virginie Rouiller-Fabre, and Gabriel Livera

Commissariat à l'Energie Atomique (M.P., N.F., C.D., T.N'T.-B., R.H., V.R.-F., G.L.), Direction des sciences du vivant/Institut de radiobiologie cellulaire et moléculaire/Service cellules souches et radiation/Laboratoire de Développement des Gonades (LDG), Unité Cellules Souches et Radiation; Université Paris-Diderot (C.D., T.N'T.-B., R.H., V.R.-F., G.L.), Sorbonne Paris Cité, LDG, Unité Mixte de Recherche (UMR)-967; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 967 (M.P., N.F., C.D., N.N'T.-B., R.H., V.R.-F., G.L.); and Université Paris-Sud (M.P., N.F.), LDG, UMR-967, F-92265 Fontenay aux Roses, France; and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Biologie de la Reproduction (A.B., M.P., N.F.) and Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction (A.B.), Hôpital Antoine Bécère, and Université Paris-Sud (A.B.), Clamart, F-92140, France

Context: The 21-hydroxylase deficiency is the most common cause of congenital adrenal hyperplasia. Pregnant women presenting a risk of genetic transmission may be treated with synthetic glucocorticoids such as dexamethasone (DEX) to prevent female fetus virilization.

Objective: The aim of this study was to assess the potential deleterious effects of DEX exposure on fetal ovarian development.

Settings: Human fetal ovaries, ranging from 8–11 weeks after fertilization, were harvested from material available after legally induced abortions. They were cultured in the absence or presence of DEX (2, 10, or 50 μM) over 14 d, and histological analyses were performed.

Results: The glucocorticoid receptor NR3C1 was present and the signaling pathway active in the fetal ovary as demonstrated by the expression of NR3C1 target genes, such as *PLZF* and *FKBP5*, in response to DEX exposure. DEX decreased germ cell density at the 10 and 50 μM doses. Exposure to DEX, even at the highest dose, did not change oogonial proliferation as monitored by 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation and significantly increased the apoptotic rate, detected with cleaved caspase 3 staining. Interestingly, the expression of the prosurvival gene *KIT* was significantly decreased in the presence of DEX during the course of the culture.

Conclusion: We have demonstrated for the first time that *in vitro* exposure to high doses of DEX impairs human fetal oogenesis through an increase in apoptosis. These data are of high importance, and additional epidemiological studies are required to investigate the female fertility of those women who have been exposed to DEX during fetal life. (*J Clin Endocrinol Metab* 97:E1890–E1897, 2012)

Drug exposure during pregnancy may have an impact on the future of adult fertility, as widely described by alterations in reproductive functions after exposure to diethylstilbestrol (1). Although the benefit/risk balance is usually assessed before starting a treatment, some pathologies will

inevitably require the use of drugs during pregnancy. This is the case for the administration of glucocorticoids (GC).

GC are involved in the final maturation of fetal organ systems and modulate inflammatory and immune responses (2). The biological response of GC is mediated

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2012-1681 Received March 14, 2012. Accepted June 27, 2012.

First Published Online July 16, 2012

Abbreviations: BrdU, 5-Bromo-2'-deoxyuridine; DEX, dexamethasone; GC, glucocorticoids; HRE, hormone response element; KIT, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; NR3C1, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; OCT4, octamer-binding transcription factor-4; 21-OHD, 21-hydroxylase deficiency; PR, progesterone receptor; wpf, wk post fertilization.

through the nuclear GC receptor [nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1) (3). Approximately 7% of pregnant women in Europe and North America are treated with dexamethasone (DEX) to promote lung maturation in fetuses at risk of preterm delivery and to prevent respiratory distress syndrome (4). Maternal DEX administration is frequently used in congenital adrenal hyperplasia like 21-hydroxylase deficiency (21-OHD). This group of genetic disorders leads to impaired enzyme function required for cortisol production, which exposes the fetus to elevated precursors and androgens. However, the efficiency of DEX treatment to prevent virilization of female fetuses is controversial. The classic form of 21-OHD can be of salt-wasting or simple-virilizing type. Epidemiological data analyses have demonstrated an overall incidence of this form of one in 15,000 live births (5), and about 75% of patients have the salt-wasting phenotype. Nonclassical 21-OHD is much more common than the classical form, with an ethnic-specific prevalence and an incidence as high as one in 27 in Ashkenazi Jews (6) and is associated with hyperandrogenemia. Prenatal treatment of 21-OHD with DEX has now been used since 1978 in France and 1986 in the United States (7). It has to be started before 9 wk post fertilization (wpf), before the onset of adrenal androgen secretion, at the dose of 20 $\mu\text{g/kg}\cdot\text{d}$ up to the delivery, to prevent virilization of female fetuses (8). Dexamethasone is used because of a long half-life of elimination and a minimal binding to maternal blood proteins, and unlike maternal endogenous GC, it escapes inactivation by the placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

Oogenesis is initiated during fetal life, and the development of the ovary determines, in part, future adult fertility. In the fetal human ovary, oogonia initially display a high mitotic activity (9) until around 12 wpf when the first signs of meiosis initiation are apparent (10, 11). Although increasing numbers of germ cells initiate meiosis, a pool of oogonia carry on proliferating until at least 16–20 wpf. At around 20 wpf, some dictated oocytes become enclosed into primordial follicles. In humans, the loss of oocytes is particularly extensive; around 70% of the 7×10^6 potential oocytes in a 14-wk-old fetus are already lost by birth, and more than 95% are lost at the beginning of puberty (12). This massive, constitutive germ cell death depends on the genetic machinery of apoptosis (13). Because the ovary contains a fixed number of nongrowing follicles at birth, the balance between apoptosis and proliferation during fetal ovarian development represents a major phenomenon in establishing maximal potential adult fecundity in women.

Knowing that GC regulate genes involved in cell death induction (14), it is conceivable to consider germ cells as a possible target of DEX. Very few studies have investigated the effects of DEX treatment on the germline. In the rodent adult testis, DEX has been proposed to impair testic-

ular germ cells through the induction of germ cell apoptosis, mediated by tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6 (FasL)/B-cell CLL/lymphoma 2 associated X protein (Bax) signaling (15–17). However, data on the DEX effect on the development or function of the ovary are limited, and the GC receptor NR3C1 has been described to be expressed and functional in adult rodent ovaries (18). It has also been shown that high doses of DEX hamper follicle differentiation and oocyte maturation in mouse ovaries (19). Furthermore, in the developing rodent gonads, other studies have reported that DEX decreased testosterone production in the testis (20) and potentiated adverse effects of environmental chemicals (21). Also, DEX has been shown to decrease postnatal follicle count in the rat ovary (22). To our knowledge, no study has ever investigated the effect of DEX on human embryonic ovaries.

Several large human studies involving the use of DEX as prenatal treatment for 21-OHD demonstrated that it did not have teratogenic effects when used according to the usual protocol (23–25). However, the effect of DEX on the ovary has not been studied in detail, and the long-term fertility of the women exposed *in utero* is unknown, since DEX treatment was initiated less than 30 yr ago. Based on GC-induced apoptosis observed in various cell types, we hypothesized that DEX treatment during pregnancy may impair the development of the human germline. We have thus conducted an experimental study that aimed to test the *in vitro* effect of DEX on the human fetal ovary. We report here that a significant increase in germ cell apoptosis was induced by DEX.

Materials and Methods

Collection of human fetal ovaries

Human fetal ovaries were harvested from material available after legally induced abortions carried out in the first trimester of pregnancy and therapeutic termination of pregnancy in the second or third trimester, *i.e.* from the sixth to the 22nd wk after conception, in the Department of Obstetrics and Gynecology at the Antoine Bécclère Hospital, Clamart (France) as previously described (26, 27). None of the induced abortions were practiced for reasons of fetal abnormality, and all fetuses appeared morphologically normal. The fetal ovaries from the therapeutic termination of pregnancies had to meet a normal histology feature before they were included in our research trial.

Our study was approved by the Biomedicine Agency, and all women gave their informed consent. The sex of the fetus was determined from the morphology of the gonads and confirmed by histological analysis of the gonad. Ovaries were thinner and more closely associated with the mesonephros than testes. The fetal age was evaluated by measuring the length of limbs and feet (28). Fetal ovaries were then prepared for organ culture or stocked in RNeasy Lysis Buffer (–80 C) (QIAGEN, Courtaboeuf, France) for gene expression profiling.

Organ culture

All tissues were cultured on Millicell-CM Biopore membranes (pore size 0.4 μm ; Millipore, Billerica, MA) in 0.3 ml Ham's F12/DMEM (1:1) containing 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO_2 at 37°C. The medium was changed every 48 h. Human ovaries were cut into small pieces before being placed separately on Millicell membranes. The vehicle (absolute ethanol) was also included in the culture medium of the paired control. The allocation of human ovary pieces into control or experimental conditions was carried out at random for each ovary.

For histology and immunohistochemistry studies, part of the ovaries was cultured in the absence or in the presence of DEX (2, 10, or 50 μM ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or in the presence of DEX (10 μM) plus progesterone (0.32 μM) for 14 d.

For the gene regulation study, part of the ovaries was used as a control and the rest cultured in the presence of DEX (50 μM) or DEX (10 μM) plus progesterone (0.32 μM), for either 6 h or 6 d, depending on the studied genes.

Immunohistochemistry

Pieces of human ovaries were fixed in Bouin's fluid at the end of the culture. For NR3C1 localization, tissues were incubated with or without DEX (50 μM) and then fixed in 4% paraformaldehyde. The fixed tissues were dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5- μm -thick sections.

Immunohistochemistry, based on peroxidase activity, was performed using commercially available primary antibodies: anti-NR3C1 (GC receptor, 1/10, mouse monoclonal antibody; Eurobio, Courtaboeuf, France), anti-KIT (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) (1/200, goat polyclonal antibody, M14; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and anti-cleaved caspase-3 Asp 175 (1/100; Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France). Five tissue sections per ovary were mounted onto glass slides, dewaxed, and boiled for 10 min in 10 mM Tris (pH 10.6) for immunostaining of cleaved caspase-3 or in 10 mM citrate (pH 6.0) for immunostaining of NR3C1 or KIT. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min. The sections were washed with PBS and blocked for 30 min with 10% BSA. Slides were incubated overnight at 4°C with the primary antibody, detected with a species-specific secondary antibody conjugated with a peroxidase activity polymer (ImmPRESS reagent kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). For all experiments, peroxidase activity was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (brown) as substrate. Histolab analysis software (Microvision Instruments, Evry, France) was used.

Measurement of germ cell density and cell proliferation

Ovarian sections (one in every 10 serial sections) were dewaxed, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin. Germ cells on each section were identified on the basis of their large spherical nuclei and clearly visible cytoplasmic membrane and counted. Normalization was achieved by dividing the number of germ cells in each fragment by the area to obtain a germ cell density. Furthermore, (Pit-Oct-Unc) class 5 homeobox 1 [octamer-binding transcription factor-4 (OCT4)] was used to confirm the germ cell feature in each condition and detected by immunohistochemistry using an anti-OCT4 antibody (1/200, Santa Cruz Biotechnology, CA).

The percentage of cells in S-phase or in apoptosis was evaluated by immunohistochemical methods. We measured 5-bromo-

2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation, using a cell proliferation kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's recommendations. BrdU (1%) was added at the end of the culture period for 3 h before tissue fixation. Briefly, three to five randomly selected sections were mounted, rehydrated, and incubated for 1 h with mouse anti-BrdU antibody and with a peroxidase-linked antimouse IgG. Peroxidase activity was then detected by 3,3'-diaminobenzidine. The BrdU incorporation index was determined by the counting (blinded to experimental group) of at least 500 germ cells (stained or unstained).

Real-time quantitative PCR

Total RNA from the whole gonad, at the end of the culture period, was extracted using the RNeasy mini kit (QIAGEN), and reverse transcription was carried out with the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

The 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) and SYBR-green or TaqMan labeling were used for quantitative RT-PCR. The comparative cycle threshold method was used to determine the relative quantities of mRNA. β -Actin was used as the endogenous reporter. All efficiencies were between 95 and 100%. Each RNA sample was run in duplicate, and all valid primers were used at a final concentration of 400 nM. Sequences of oligonucleotides used with SYBR-green detection were designed with Primer Express software (Table 1).

Statistical analysis

All values are expressed as means $\pm$ SEM. Graphics shown in the figures are representative of at least three experiments. Data were analyzed using paired Student's *t* test when a single treatment was performed (see Figs. 1D, 2C, and 4A). Other mean values were compared using one-way ANOVA (see Figs. 1E, 2A, and 3) with GraphPad Instat version 3.06.

Correlation between DEX concentration and germ cell density was carried out using the Pearson's test (see Fig. 2A). Statistical significances were set at $P < 0.05$.

TABLE 1. Quantitative RT-PCR primer sequences

Gene	Primer sequences (5'–3')
Human β -actin	
Forward	TGACCCAGATCATGTTTGTGAGA
Reverse	TACGCCAGAGGGGTACAGC
Human NR3C1	
Forward	TTCCCTGGTCTGAACAGTTTT
Reverse	TGTTGTTGCTGTTGAGGAGC
Human PLZF	
Forward	GCTTCTGATAACGAGGCTG
Reverse	CCGCTGAATGAGCCAGTAA
Human FKBP5	
Forward	GCGGAGAGTGACGAGTC
Reverse	TGGGGCTTTCTTCATTGTTTC
Human KIT	Applied Biosystems probe accession no. Hs00174029-A1
Human NR3C1 α	
Forward	GAAGGAACTCCAGCCAGAACTG
Reverse	GATGATTTTCAGCTAACATCTCG
Human NR3C1 β	
Forward	GAAGGAACTCCAGCCAGAACTG
Reverse	TGAGCGCCAAGATTGTTGG

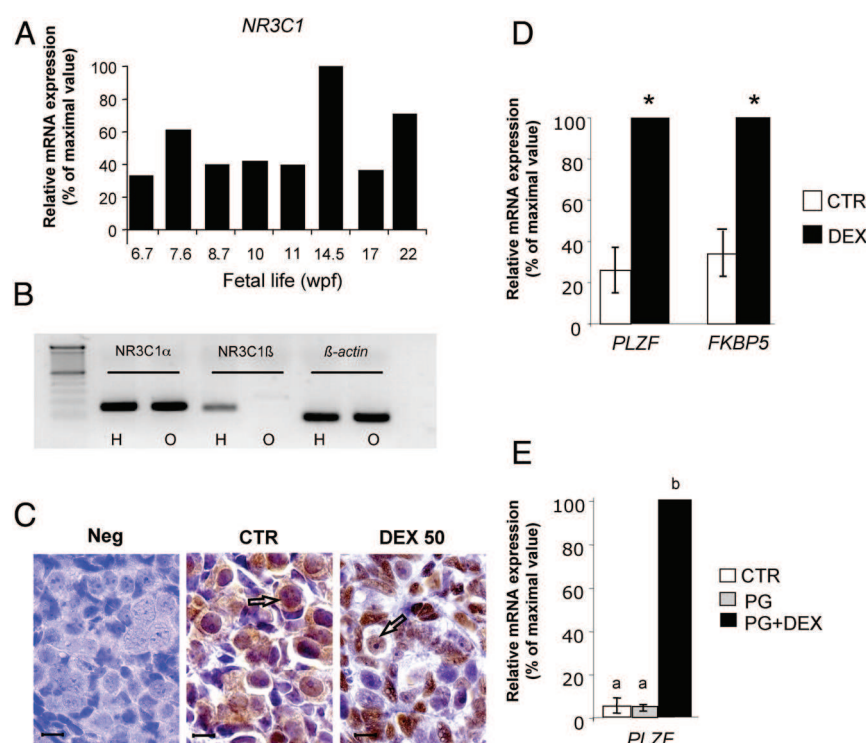


FIG. 1. GC receptor is expressed and active in human fetal ovaries. **A**, *NR3C1* gene expression was measured by quantitative RT-PCR in human fetal ovaries. Fetal ovaries were harvested at the indicated development stage ($n = 3$ for 6.7, 7.6, 8.7, 10, and 11 wpf; $n = 1$ for 14.5 and 17 wpf, and $n = 2$ for 22 wpf). **B**, *NR3C1* gene expression for isoforms α (*NR3C1* α) and β (*NR3C1* β) measured by RT-PCR in positive control cell line HEK 293 (H) and human fetal ovary of 11 wpf (O). A 100-bp ladder was used. **C**, Human fetal ovary (9.2 wpf) incubated without [control (CTR)] or with 50 μM DEX (DEX 50) for 30 min. Open arrows indicate germ cells positive for *NR3C1* detected by immunohistochemistry. Scale bar, 10 μm . On the left, the negative control (Neg) was obtained by incubating sections without first antibody. **D**, *PLZF* and *FKBP5* gene expression levels were assessed by quantitative RT-PCR in fetal ovaries cultured for 6 h without (white bar; $n = 6$) or with 50 μM DEX (black bar; $n = 6$). Six fetal ovaries ranging from 7.4–10.2 wpf were included in this experiment. *, $P < 0.05$ in the paired Student's t test comparisons with control. **E**, *PLZF* gene expression was assessed by quantitative RT-PCR in fetal ovaries cultured for 6 h without (white bar; $n = 3$) or with 0.32 μM progesterone (PG) (gray bar; $n = 3$) or 10 μM DEX plus 0.32 μM progesterone (black bar; $n = 3$). Fetal ovaries included were at 7.8–10.2 wpf. Gene (mRNA) expression levels were normalized against β -actin. Different letters represent significantly different values in ANOVA comparisons, with $P < 0.05$.

For gene expression, statistical analyses were carried out using raw change in cycle threshold values. Data were later converted to percentage of maximal value for each gene (see Figs. 1, D and E, and 4A).

Results

GC receptor is expressed and active in human fetal ovaries

NR3C1 gene expression was analyzed in human fetal ovaries according to development stage and revealed the presence of GC receptor (Fig. 1A). Comparable expression levels were observed between different developmental stages from 6.7–22 wpf. To specify which subtype (α and/or β) of the receptor was expressed in fetal ovaries, the expression of the two isoforms was assessed. At all stages

studied (from 6–22 wpf), we have been unable to detect the expression of the β -isoform by RT-PCR, whereas the α -subtype was strongly expressed in the human fetal ovary (data not shown and Fig. 1B for 11-wpf ovaries).

Using immunohistochemistry, we detected *NR3C1* protein both in germ and somatic cells (Fig. 1C). Furthermore, to ensure the specificity of the signal, we incubated a fetal ovary in the presence of DEX (50 μM) for 30 min; under this condition, we observed a clear shift of the staining toward the nuclear compartment. In all sections studied, *NR3C1* was ubiquitously expressed and the staining in germ cells presented a variable intensity with cells barely labeled up to cells displaying a robust staining without any correlation with the age or the localization within the ovaries.

To assess whether the GC receptor was indeed functional in fetal ovaries, we investigated the effect of a 6-h DEX treatment on the expression of two known GC-target genes: the FK506-binding protein (*FKBP5*) (29) and the zinc finger and BTB domain containing 16 (*ZBTB16* also named *PLZF*) (30) (Fig. 1D). Both genes responded to DEX treatment with a significant mRNA increase compared with control, confirming that the GC receptor was present and functional in human fetal ovaries.

Embryonic gonads are exposed to high levels of progesterone during pregnancy. Because *PLZF* can be induced by progesterone in both endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells (30), we wanted to clarify whether progesterone compromises the effect of DEX on *PLZF* expression. As shown in Fig. 1E, the 6-h exposure to progesterone alone did not increase *PLZF* expression compared with control samples. However, DEX strongly stimulated *PLZF* in the presence of progesterone.

DEX decreased germ cell density in human fetal ovaries

After 14 d organ culture, we investigated the effect of DEX on germ cells. As shown in Fig. 2A, DEX significantly decreased germ cell density by 26 and 46% at the 10 and 50 μM doses, respectively. Furthermore, we observed a

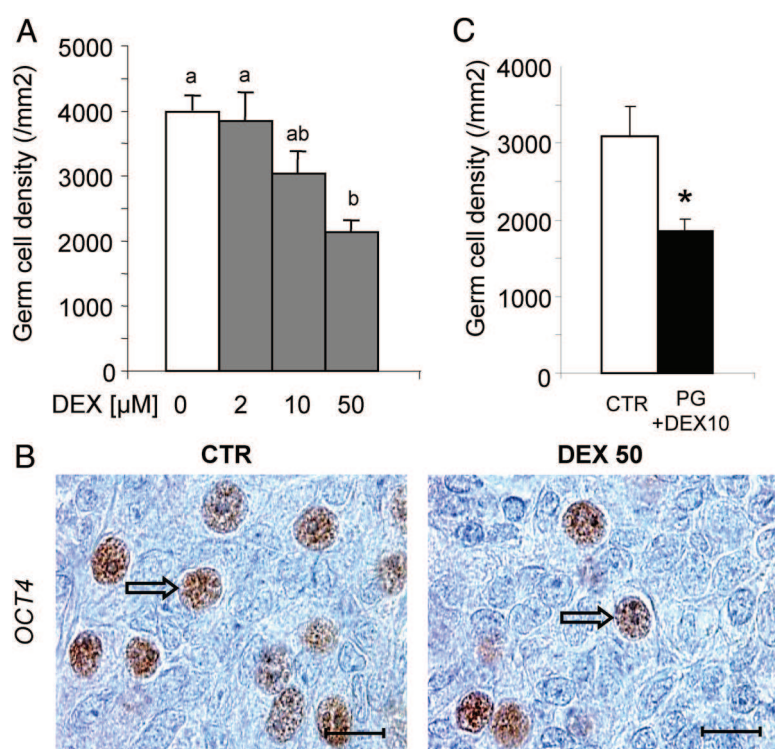


FIG. 2. DEX decreased germ cell density in human fetal ovaries. A, Human fetal ovaries ($n = 6$) ranging from 7.3–10.8 wpf were cultured without (control) or with DEX for 14 d. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of six cultures. Different letters represent significantly different values in ANOVA comparisons, with $P < 0.05$. B, Open arrows indicate germ cells positive for OCT4 detected by immunohistochemistry. The bar represents 10 μ m. C, Human fetal ovaries ($n = 3$) ranging from 6.9–8.6 wpf were cultured without (white bar) or with 10 μ M DEX plus 0.32 μ M progesterone (PG) (black bar). *, $P < 0.05$ in the paired Student's t test comparisons with control. CTR, Control.

robust negative correlation between DEX concentration and germ cell density ($\rho = -0.70$; $P = 0.0002$ with the Pearson correlation test). The negative effect of DEX was further shown histologically by staining of the germ cell marker OCT4 (Fig. 2B). Interestingly, treatment with both DEX (10 μ M) and progesterone further reduced the germ cell density (39%) when compared with DEX (10 μ M) alone (Fig. 2C).

Dexamethasone increases apoptotic rate of oogenesis

To determine whether the DEX-induced reduction of germ cell density originated from an alteration in proliferation or apoptosis of germ cells, the oogonal proliferative rate was assessed by measuring BrdU incorporation. After 14 days' organ culture, about 30% of the germ cells incorporated BrdU during a 3 h period (Fig. 3A). No significant difference was observed between control and DEX-exposed ovaries, whatever the concentration used. Apoptotic germ cells were identified as large cells that stained for cleaved caspase-3. Only the highest DEX concentration used (50 μ M) significantly amplified germ cell

apoptosis ($5.4 \pm 2.1\%$ vs. $2.1 \pm 0.8\%$ in control) leading to a 2.9-fold increase (Fig. 3B).

DEX exposure decreased KIT expression in human fetal ovaries

The v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) has been proven to be both a gene repressed by *PLZF* and a gene crucial for germ cell survival in the mouse. We therefore investigated the effect of DEX on *KIT* expression after 6 d organ culture with or without 50 μ M DEX. DEX significantly decreased the *KIT* expression level by 33% (Fig. 4A). Immunostaining against *KIT* protein evidenced fewer germ cells presenting a clear signal in the DEX-treated ovaries (Fig. 4B).

Discussion

This work is the first experimental demonstration of the potential deleterious effect that DEX exposure has on the human female fetal germline. Using organ culture, we demonstrated that DEX both decreased the germ cell density

and increased the apoptotic rate of germ cells without affecting their proliferation rate. Thus, DEX most likely decreased the number of germ cells in the human fetal ovary and potentially at birth.

Altogether we have shown that the GC receptor *NR3C1* was expressed and active after DEX treatment in the developing ovary. Alternative splicing of exon 9 of the *NR3C1* gene results in the synthesis of two protein isoforms (α and β) with *NR3C1* β being unable to bind the ligand. In the human fetal ovary, we demonstrated that only *NR3C1* α was produced. The activity of the *NR3C1* receptor was evidenced both by its translocation to the nucleus and by the expression of known target genes in response to DEX treatment. Among the *NR3C1* target genes, we report here for the first time the expression of *PLZF* in an embryonic mammalian ovary. These data are of particular interest because *PLZF* is known to be the gatekeeper gene of male germ stemness (31, 32) and can be used as a specific marker of stem/immature progenitor in the fetal testis in mice (33). In the mouse adult testis, *PLZF* has been demonstrated to directly repress *KIT* expression (34). This is in accordance with our data, which showed

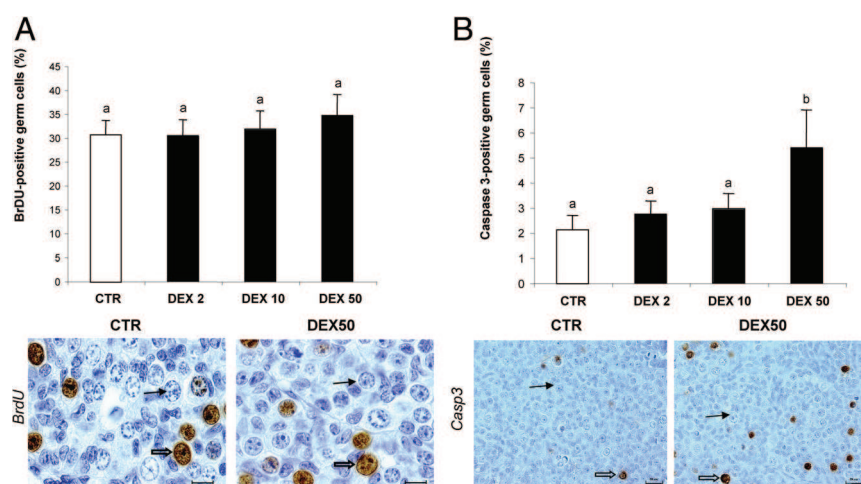


FIG. 3. Oogonial proliferative and apoptotic rates after DEX exposure. Human fetal ovaries ranging from 7.3–10.8 wpf were cultured with or without DEX for 14 d. Each column is the mean $\pm$ SEM of six cultures. Different letters represent significantly different values in ANOVA comparisons, with $P < 0.05$. Incorporation of BrdU (A) and cleaved-caspase3 (Casp3) (B) was detected by immunohistochemistry. Black arrows indicate negative and open arrows positive germ cells. Scale bar, 10 μ m for BrdU and 20 μ m for Casp3.

that DEX both induced *PLZF* and decreased *KIT* expression levels. *KIT* is well known to be required for primordial germ cell survival both in the mouse and human (35–37). In this regard, a decrease in *KIT* expression was likely to contribute to the DEX-induced germ cell apoptosis. This hypothesis fits well with our observation of a specific

effect of DEX on oogonial apoptosis, as we have shown by the presence of cleaved-caspase 3 in DEX-treated germ cells that resulted in a decrease in germ cell number. Although no obvious increase of cleaved-caspase 3 was detected at the 10 μ M dose, germ cell density was decreased at this dose. We hypothesize that this apparent discrepancy is due to the germ cell density being a more sensitive indicator because it sums up cell death that occurred during the whole culture period, whereas the detection of apoptotic marker represents cellular events only at a given instant. On the other hand, one may also consider that DEX can induce cell death in a caspase-independent manner.

To date, only one study described an effect of DEX on the ovary during fetal life (22). This study reported that, in the rat, DEX exposure during late pregnancy decreased the offspring's pool of follicles, observed shortly after birth (sc 1.0 mg DEX/kg body weight). This *in vivo* report is in accordance with our *in vitro* data using a human fetal ovary, because DEX treatment in the rat was initiated at 16 d after conception, when most germ cells are still at the oogonial stage.

Interestingly, progesterone potentiated the effect of DEX treatment in human fetal ovaries. During the first trimester of pregnancy, progesterone receptor (PR) was expressed at very low levels in human embryonic ovaries (38) (personal observation). This may explain why progesterone alone was unable to stimulate *PLZF* expression by itself as demonstrated in endometrial tissues that expressed a high level of PR (30). However, low levels of PR may act synergistically with NR3C1 because both can bind the same hormone response element (HRE) (39). In this regard, the effect of low doses of DEX in combination with progesterone naturally present during pregnancy requires serious consideration, although future studies will be required to clarify the exact molecular mechanisms involved.

We have shown that the deleterious effect of DEX alone *in vitro* was observed only starting from the 10 μ M dose. Previous *in vitro* studies using other human primary cells, such as lens epithelial cells and tenocytes, have also described a DEX-induced cell death, with doses ranging from 1–100 μ M (40, 41). The comparison between doses used *in vitro* and the expected *in vivo* exposure is hard to perform because few *in vivo* data are available, especially during pregnancy. However, a pharmacokinetic evaluation of DEX carried out by Loew *et al.* (42) described a

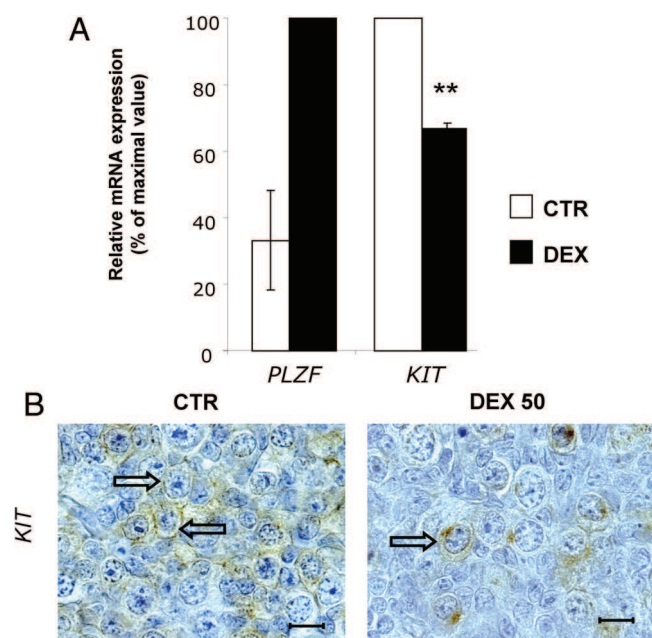


FIG. 4. Dexamethasone exposure decreased *C-KIT* expression in human fetal ovaries. A, *PLZF* and *C-KIT* gene expression was assessed by quantitative RT-PCR in fetal ovaries cultured over 6 d without (white bar; $n = 3$) or with 50 μ M DEX (black bar; $n = 3$). Three human fetal ovaries ranging from 7–9 wpf were included in this experiment. **, Significantly different with P value = 0.00329 vs. control in the paired Student's t test with. Gene (mRNA) expression was normalized against β -actin. B, Open arrows indicate germ cells positive for *KIT* detected by immunohistochemistry. Scale bar, 10 μ m.

maximal serum concentration of 13.9 ng/ml (about 35 μ M) after a 1.5-mg oral administration. Moreover, it is difficult to assume the possible consequences of a longer exposure because our study was limited to 2 wk, whereas the proliferation of the human oogonia *in vivo* is observed for more than 14 wk (*i.e.* starting at 6 wpf and ending after 20 wpf). Two clinical protocols have to be considered due to the potential different deleterious effects of administering DEX. First, to promote lung maturation in preterm delivery, one high-dose bolus is administered late during fetal life, around 26 wpf, when few oogonia are still detectable (personal observation). The long-term treatment of 21-OHD deficiency starts before 9 wpf, resulting in an exposure to DEX during the window of development for the fetal ovary. The effects of DEX treatment during a short or long exposure and/or according to the age of the ovary at the time of administration require further research.

In conclusion, altogether our data indicate that DEX alone or in the presence of progesterone induced germ cell apoptosis in the human fetal ovary *in vitro*. Whether DEX has the same effect *in vivo* and the consequences of such a loss of germ cell require additional investigations. In particular, epidemiological studies will be of the utmost importance. DEX treatment during pregnancy started in the early 1980s. If exposure of female fetuses to DEX compromises the oogonial stock and thus constitutes a risk factor of developing premature ovarian failure, an epidemiological study will need to be conducted in the coming years. Indeed, the first of these women are below 30 yr old, whereas premature ovarian failure is defined as a malfunction of the ovary before 40 yr of age.

Acknowledgments

We are grateful to the staff within the department of Obstetrics and Gynecology of the Antoine Bécère Hospital (Clamart, France), in particular S. Pozzi who delivered information to patients who consented to the use of their fetuses for research. We thank Dr. V. Muczinski for his technical assistance to harvest fetal ovaries, Dr. M. Lombès and G. Meduri for their invaluable help with the NR3C1 IHC protocol, S. Messiaen for his invaluable help with the OCT4 IHC protocol, A. Gouret for her skillful secretarial assistance, and AngloScribe (Calvisson, France) for English language editing. Additionally, we thank J. Bernardino-Sgherri and B. Souquet for their critical reading of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Nelly Frydman, Laboratoire de Développement des Gonades Batiment 05 Porte A011B Commissariat à l'Energie Atomique-DSV/iRCM/SCSR/LDG Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: nelly.frydman@abc.aphp.fr.

This work was supported by the University Paris-Diderot (Paris VII), Paris-Sud (Paris XI), Commissariat à l'Energie Atomique, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Hoover RN, Hyer M, Pfeiffer RM, Adam E, Bond B, Cheville AL, Colton T, Hartge P, Hatch EE, Herbst AL, Karlan BY, Kaufman R, Noller KL, Palmer JR, Robboy SJ, Saal RC, Strohsnitter W, Titus-Ernstoff L, Troisi R 2011 Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *N Engl J Med* 365:1304–1314
- Michael AE, Papageorgiou AT 2008 Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update* 14:497–517
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS 2000 Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 18:309–345
- Marciniak B, Patro-Małyś J, Poniedziałek-Czajkowska E, Kimber-Trojnar Z, Leszczyńska-Gorzelak B, Oleszczuk J 2011 Glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Biotechnol* 12:750–757
- Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S 1988 Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81:866–874
- Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI 1985 High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:650–667
- David M, Forest MG 1984 Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 105:799–803
- Lo JC, Schwitzgebel VM, Tyrrell JB, Fitzgerald PA, Kaplan SL, Conte FA, Grumbach MM 1999 Normal female infants born of mothers with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84:930–936
- Bendsen E, Byskov AG, Andersen CY, Westergaard LG 2006 Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod* 21:30–35
- Gondos B, Westergaard L, Byskov AG 1986 Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol* 155:189–195
- Le Bouffant R, Guerquin MJ, Duquenne C, Frydman N, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Frydman R, Habert R, Livera G 2010 Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 25:2579–2590
- Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF 1991 Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec* 231:201–208
- Tilly JL 1996 Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1:162–172
- Robertson NM, Bodine PV, Hsu TC, Alnemri ES, Litwack G 1995 Modulator inhibits nuclear translocation of the glucocorticoid receptor and inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in the human leukemic cell line CEM C-7. *Cancer Res* 55:548–556
- Yazawa H, Sasagawa I, Nakada T 2000 Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Hum Reprod* 15:1917–1920
- Orazizadeh M, Khorsandi LS, Hashemitabar M 2010 Toxic effects of dexamethasone on mouse testicular germ cells. *Andrologia* 42:247–253
- Orazizadeh M, Hashemitabar M, Khorsandi L 2009 Protective effect of minocycline on dexamethasone induced testicular germ cell apoptosis in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 13:1–518
- Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF 1982 Rat ovary glucocor-

- ticoid receptor: identification and characterization. *Steroids* 39: 569–584
19. Van Merriis V, Van Wemmel K, Cortvriendt R 2007 In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. *Reprod Toxicol* 23:32–41
 20. Lalau JD, Aubert ML, Carmignac DF, Grégoire I, Dupouy JP 1990 Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology* 51:289–293
 21. Drake AJ, van den Driesche S, Scott HM, Hutchison GR, Seckl JR, Sharpe RM 2009 Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology* 150:5055–5064
 22. Ristić N, Nestorović N, Manojlović-Stojanoski M, Filipović B, Sosia-Jurjević B, Milosević V, Sekulic M 2008 Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *J Microsc* 232:549–557
 23. Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI 1995 Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2014–2020
 24. Lajic S, Wedell A, Bui TH, Ritzén EM, Holst M 1998 Long-term somatic follow-up of prenatally treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3872–3880
 25. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, Lin-Su K, Putnam AS, Wei JQ, Wilson RC 2001 Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5651–5657
 26. Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, Donnadiou AC, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V 2006 Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2696–2703
 27. Guerquin MJ, Duquenne C, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Lambrot R, Bakalska M, Frydman R, Habert R, Livera G 2009 Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. *Hum Reprod* 24:670–678
 28. Evtouchenko L, Studer L, Spenger C, Dreher E, Seiler RW 1996 A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. *Cell Transplant* 5:453–464
 29. U M, Shen L, Oshida T, Miyauchi J, Yamada M, Miyashita T 2004 Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia* 18:1850–1856
 30. Fahnenstich J, Nandy A, Milde-Langosch K, Schneider-Merck T, Walther N, Gellersen B 2003 Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 9:611–623
 31. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE 2004 Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 36:647–652
 32. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP 2004 Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36: 653–659
 33. Moreno SG, Attali M, Allemand I, Messiaen S, Fouchet P, Coffigny H, Romeo PH, Habert R 2010 TGF β signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. *Dev Biol* 342: 74–84
 34. Filippini D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP, Dolci S 2007 Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol Cell Biol* 27:6770–6781
 35. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S 1991 Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 113:689–699
 36. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL 1991 Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353:750–752
 37. Robinson LL, Gaskell TL, Saunders PT, Anderson RA 2001 Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Mol Hum Reprod* 7:845–852
 38. Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, Kinnell H, Mason JI, Evans DB, Bhattacharya S, Flannigan S, Franks S, Monteiro A, O'Shaughnessy PJ 2011 Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1754–1762
 39. Umesono K, Evans RM 1989 Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57:1139–1146
 40. Petersen A, Carlsson T, Karlsson JO, Jonhede S, Zetterberg M 2008 Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture. *Mol Vis* 14:1344–1352
 41. Wong MW, Lui WT, Fu SC, Lee KM 2009 The effect of glucocorticoids on tendon cell viability in human tendon explants. *Acta Orthop* 80:363–367
 42. Loew D, Schuster O, Graul EH 1986 Dose-dependent pharmacokinetics of dexamethasone. *Eur J Clin Pharmacol* 30:225–230

Résumé

Depuis plusieurs années, un nombre conséquent d'études décrivent une augmentation de l'incidence de pathologies liées à la fonction de reproduction masculine. Ces anomalies ont été regroupées sous le terme de « syndrome de dysgénésie testiculaire ». Ce syndrome aurait pour origine les effets délétères de polluants environnementaux sur le développement du testicule en période fœtale. Parmi ces polluants environnementaux, les phtalates et le bisphénol A (BPA) sont les plastifiants les plus produits et les plus répandus dans les objets de consommation courante. De nombreuses études leur sont consacrées et ont permis de les classer au rang de perturbateurs endocriniens en mettant notamment en cause leurs effets reprotoxiques. Mon travail de thèse est une étude des effets de ces deux perturbateurs endocriniens sur le développement du testicule fœtal.

Nous avons réalisé une première étude concernant les effets du BPA sur le développement du testicule fœtal. Grâce au modèle de culture organotypique, nous avons développé notre étude dans trois espèces : le rat, la souris et l'Homme. Nous démontrons que le BPA diminue la sécrétion de testostérone dans le testicule fœtal humain à partir d'une concentration de 10^{-8} M, alors que chez le rat et la souris, la sécrétion de testostérone n'est affectée qu'à partir de 10^{-5} M de BPA. Nous avons également démontré une diminution de l'expression du gène de *Ins1-3*, dans ces mêmes conditions. Ceci nous a permis de mettre en évidence une différence de sensibilité entre les espèces. Pour tenter de comprendre les mécanismes par lesquels le BPA exerce son effet toxique, nous avons comparé ses effets à ceux du DES, autre perturbateur endocrinien œstrogénomimétique. Contrairement au BPA, le DES diminue la sécrétion de testostérone fœtale chez les rongeurs, et non chez l'Homme. Ce résultat suggère l'implication de deux voies de signalisation différentes pour ces deux xéno-œstrogènes. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par l'étude que nous avons réalisée sur des souris invalidées pour le récepteur des œstrogènes ER α , dans lesquelles l'effet anti-androgénique du BPA persiste, contrairement à celui du DES.

Parallèlement, nous avons recherché les mécanismes d'action des phtalates et de leur métabolite actif le plus répandu, le MEHP (mono-2-éthyl-hexyl phtalate). Dans la continuité de plusieurs travaux réalisés dans notre laboratoire sur les effets du MEHP, nous avons tenté de comprendre les mécanismes par lesquels le MEHP induit un effet pro-apoptotique dans les cellules germinales mâles. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du gène *Stra8* dans les cellules germinales traitées au MEHP. Ce résultat nous suggère que le MEHP pourrait induire une différenciation erronée des cellules germinales mâles. De plus, nous avons recherché les récepteurs et la voie de signalisation activée par le MEHP. Nous observons que les agonistes des récepteurs PPAR α et de PPAR γ entraînent dans les cellules germinales les mêmes phénotypes que le MEHP, à savoir une augmentation du taux d'apoptose et de l'expression du gène *Stra8*.