



**HAL**  
open science

# Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain : effets et mécanismes des phtalates

Vincent Muczynski

► **To cite this version:**

Vincent Muczynski. Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain : effets et mécanismes des phtalates. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T011 . tel-00631554

**HAL Id: tel-00631554**

**<https://theses.hal.science/tel-00631554>**

Submitted on 12 Oct 2011

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

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

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

Vincent MUCZYNSKI

Le 11 Avril 2011

POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX ET DEVELOPPEMENT  
DU TESTICULE FŒTAL HUMAIN : EFFETS ET MECANISMES  
D'ACTION DES PHTALATES

Directeur de thèse : Pr. Virginie Rouiller-Fabre

JURY

Pr. Jacques YOUNG	Président
Dr. David VOLLE	Rapporteur
Dr. Christelle DELALANDE	Rapporteur
Pr. Robert BAROUKI	Examineur
Pr. René FRYDMAN	Examineur
Pr. Virginie ROUILLER-FABRE	Directeur de thèse
Pr. René HABERT	Invité



Je tiens à remercier sincèrement les membres de mon jury d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je remercie notamment le Professeur Jacques Young d'avoir accepté la charge de président du jury de cette thèse.

J'adresse également tous mes remerciements aux docteurs Christelle Delalande et David Volle, pour avoir assumé la lourde tâche d'être mes rapporteurs et de m'avoir fait part de leur intérêt pour ce travail.

Enfin je tiens aussi à remercier les professeurs René Frydman et Robert Barouki d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.



# TABLES DES MATIERES

<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>2</b>
--------------------------	----------

---

<b>ETAT DE L'ART .....</b>	<b>8</b>
----------------------------	----------

---

CHAPITRE I. LE DEVELOPPEMENT DU TESTICULE FŒTAL HUMAIN.....	10
---	----

<i>I. Structure indifférenciée, la gonade bipotentielle.....</i>	<i>10</i>
--	-----------

I.1. Formation de la crête génitale.....	10
--	----

I.2. Migration des Cellules Germinales Primordiales.....	13
--	----

<i>II. Déterminisme génétique de la différenciation testiculaire.....</i>	<i>15</i>
---	-----------

II.1. SRY et l'origine de la différenciation sexuelle.....	15
--	----

II.2. Contrôle génétique complexe de la différenciation testiculaire .....	15
--	----

<i>III. Mise en place et caractéristiques des différents types cellulaires.....</i>	<i>22</i>
---	-----------

III.1. Les cellules somatiques du testicule, support de l'architecture testiculaire .....	22
---	----

III.1.1 Les cellules de Sertoli.....	22
--------------------------------------	----

III.1.2 Les cellules de Leydig .....	26
--------------------------------------	----

III.1.3 Cellules pérítubulaires myoïdes et autres cellules interstitielles : .....	31
--	----

III.2. La lignée germinale.....	32
---------------------------------	----

III.2.1 Développement des cellules germinales au cours de la vie fœtale:.....	32
---	----

III.2.2 Les différentes populations de cellules germinales et leurs marqueurs:.....	34
---	----

III.2.3 Facteurs impliqués dans la régulation du nombre des cellules germinales fœtales : .....	39
---	----

<i>IV. Méthodes d'étude du testicule fœtal humain. ....</i>	<i>42</i>
---	-----------

IV.1. Le modèle de culture organotypique.....	42
---	----

IV.2. L'isolement de cellules germinales.....	44
---	----

IV.2.1 MicroDissection Laser (MDL).....	44
---	----

IV.2.2 Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS). .....	45
--	----

IV.2.3 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). .....	45
--	----

CHAPITRE II. PERTURBATION DU DEVELOPPEMENT TESTICULAIRE FŒTAL .....	47
---	----

<i>I. Le Syndrome de Dysgénésie Testiculaire. ....</i>	<i>47</i>
--	-----------

I.1. Données cliniques.....	47
-----------------------------	----

I.2. Origine fœtale du TDS.....	49
---------------------------------	----

I.2.1 Hypospadias et cryptorchidie.....	50
---	----

I.2.2 Réduction de la production spermatique.....	50
---	----

I.2.3 Cancer testiculaire.....	51
--------------------------------	----

I.3. Etiologie du syndrome de dysgénésie testiculaire.....	52
--	----

I.3.1 Origine génétique. ....	52
-------------------------------	----

I.3.2 Hypothèse de l'influence de facteurs environnementaux.....	53
--	----

<i>II. Les Phtalates.....</i>	<i>55</i>
-------------------------------	-----------

II.1. Généralités.....	56
------------------------	----

II.1.1 Métabolisme des phtalates.....	57
II.1.2 Concentrations de phtalates.....	60
II.1.2.1. Méthodes de mesure. ....	60
II.1.2.2. Niveaux de phtalates dans les fluides biologiques. ....	60
II.1.2.3. Potentiels effets additifs.....	62
II.2. Toxicité des phtalates sur l'organisme.....	63
II.2.1 Effets des phtalates sur le foie.....	63
II.2.2 Effets des phtalates sur la thyroïde et le système immunitaire.....	64
II.2.3 Effets sur la fonction de reproduction. ....	65
II.2.3.1. Chez l'animal.....	65
a. Exposition de l'individu prépubère et adulte.....	65
b. Exposition pendant la vie fœtale et néonatale. ....	67
II.2.3.2. Chez l'Homme.....	73
a. Fonction de reproduction chez la femme.....	73
b. Fonction de reproduction chez l'Homme. ....	74
<i>III. Mécanismes d'action des phtalates. ....</i>	<i>75</i>
III.1. Mécanismes d'action cellulaires des phtalates dans le testicule.....	75
III.1.1 Mécanismes d'action des phtalates sur les cellules de Leydig.....	75
III.1.2 Mécanismes d'action des phtalates sur les cordons séminifères. ....	77
III.2. Implication des récepteurs nucléaires dans les effets des phtalates. ....	79
III.2.1 Généralités à propos des récepteurs nucléaires.....	79
III.2.1.1. Structure moléculaire.....	79
III.2.1.2. Modes de fonctionnement des récepteurs nucléaires.....	81
III.2.1.3. Classification des récepteurs nucléaires. ....	83
III.2.2 Implication des récepteurs nucléaires dans les mécanismes d'actions liés au phtalates.....	85
III.2.2.1. La voie des PPARs. ....	85
III.2.2.2. La voie des récepteurs aux hormones stéroïdes.....	87
III.2.2.3. La voie des autres récepteurs nucléaires.....	89

## **MATERIELS ET METHODES ..... 92**

---

<i>I. Prélèvement des testicules foetaux humains : .....</i>	<i>94</i>
<i>II. Culture organotypique : .....</i>	<i>95</i>
II.1. Produits et réactifs employés : .....	95
II.2. Méthode de culture : .....	96
<i>III. Tri de cellules : .....</i>	<i>97</i>
<i>IV. Stratégies d'analyse : .....</i>	<i>98</i>
IV.1. Histologie : .....	98
IV.1.1 Préparation des échantillons.....	98
IV.1.2 Immunohistochimie.....	99
IV.1.2.1. Comptage des cellules germinales. ....	100
IV.1.2.2. Quantification de l'apoptose et de la prolifération. ....	101
IV.2. Analyse d'expression de gène : .....	101

IV.2.1 Extraction d'ARN.....	101
IV.2.2 Real Time quantitative PCR (RTqPCR) : .....	101
IV.2.3 Plaques Microfluidiques. : .....	103
IV.3. Analyses protéiques : .....	103
IV.3.1 Extraction et dosage de protéines :.....	103
IV.3.2 Gel d'électrophorèse et Western Blot : .....	104
IV.3.3 Immunodétection des protéines - Western Multiplex : .....	105
IV.4. Dosage radioimmunologique de la testostérone : .....	105
V. Statistiques : .....	106

---

**RESULTATS..... 108**

ARTICLE 1 : .....	110
ARTICLE 2 : .....	113
ARTICLE 3 : .....	116

---

**DISCUSSION ..... 119**

<i>I. modèle d'étude : la culture organotypique de testicule fœtal humain .....</i>	<i>122</i>
<i>II. Effets des phtalates et mécanismes d'action.....</i>	<i>123</i>
<i>III. Intégration de nos données dans le contexte des polluants environnementaux.....</i>	<i>131</i>
<i>IV. Perspectives .....</i>	<i>132</i>

---

**BIBLIOGRAPHIE ..... 135**

---

**ANNEXES..... 177**

ARTICLE COMPLEMENTAIRE N°1 : .....	179
ARTICLE COMPLEMENTAIRE N°2 : .....	182
Liste des publications : .....	185



## TABLES DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Différenciation du tractus génital humain au cours de la vie fœtale.</i>	11
<i>Figure 2 : Parcours migratoire des CGPs lors du développement embryonnaire.</i>	14
<i>Figure 3 : Balance de la régulation du déterminisme sexuel de la gonade fœtale.</i>	21
<i>Figure 4 : Formation des cordons séminifères au cours du développement.</i>	23
<i>Figure 5 : Evolution du nombre de cellules de Sertoli humaines au cours de la vie fœtale et post-natale.</i>	24
<i>Figure 6 : Evolution du nombre de cellules de Leydig au cours de la vie fœtale et néonatale.</i>	27
<i>Figure 7 : Variations des niveaux de testostérone sérique pendant la vie fœtale et néonatale.</i>	28
<i>Figure 8 : Fenêtre de masculinisation au cours du développement fœtal.</i>	29
<i>Figure 9 : Evolution au cours du développement, des différentes sous populations de cellules germinales fœtales chez l'Homme.</i>	33
<i>Figure 10 : Expression, chez l'Homme, des principaux antigènes caractéristiques des cellules germinales mâles au cours de la vie fœtale.</i>	35
<i>Figure 11 : Evolution des différentes anomalies de la fonction de reproduction mâle humaine, au cours des dernières décennies.</i>	48
<i>Figure 12 : Hypothèse de l'origine du syndrome de dysgénésie Testiculaire (TDS).</i>	49
<i>Figure 13 : Formule semi développée de la structure générale des phtalates.</i>	55
<i>Figure 14 : Représentation schématique générale des métabolisations primaire et secondaire des diester phtaliques à chaînes carbonées longues.</i>	57
<i>Figure 15 : Représentation schématique de la métabolisation primaire du Di-2-EthylHexyl-Phtalate.</i>	59
<i>Figure 16 : Structure générale des récepteurs nucléaires.</i>	80
<i>Figure 17 : Mode de fonctionnement général des récepteurs nucléaires séquestrés dans le cytoplasme.</i>	81
<i>Figure 18 : Mode de fonctionnement général des récepteurs nucléaires séquestrés dans le noyau.</i>	82

---

<i>Tableau 1 : Synthèse des principaux gènes impliqués dans la mise en place de la gonade bipotentielle chez l'Homme.</i>	12
<i>Tableau 2 : Synthèse des principaux gènes impliqués dans la différenciation testiculaire chez l'Homme.</i>	17
<i>Tableau 3 : Synthèse des principaux gènes impliqués dans la différenciation de l'ovaire fœtal humain.</i>	19
<i>Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principaux antigènes exprimés par les différentes sous populations de cellules germinales au cours de la vie fœtale chez l'Homme.</i>	37
<i>Tableau 5 : Récapitulatif des taux de MEHP mesurés dans les différents fluides biologiques de la femme.</i>	61
<i>Tableau 6 : Effets d'une exposition fœtale aux phtalates sur les fonctions testiculaires néonatale ou adulte en fonction de l'espèce.</i>	67
<i>Tableau 7 : Effets d'une exposition fœtale aux phtalates sur les différents types cellulaires du testicule fœtal en fonction de l'espèce.</i>	71
<i>Tableau 8 : Nomenclature et classification des récepteurs nucléaires humains selon leur homologie de structure.</i>	84



## LISTE DES ABREVIATIONS

3

---

3T3-L1 : Lignée cellulaire murine de préadipocytes  
3βHSD : 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase

A

---

ADN : Acide DéoxyriboNucléique  
AF-1 : Activation Function-1  
AF-2 : Activation Function-2  
AMH : Anti-Müllerian Hormone  
AMPc : cyclic Adenosine MonoPhosphate  
AP-2γ : Activator Protein 2 gamma  
APES : 3-aminopropyltriéthoxylane  
AR : Androgen Receptor  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : Adenosine TriPhosphate  
ATRX : Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked

B

---

BBP : ButylBenzyl-Phtalate  
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BPES : Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus inversus Syndrome

C

---

c-FLIP : FLICE-like inhibitory protein  
c-KIT : Récepteur membranaire du SCF  
c/ebp β : CCAAT / enhancer binding protein beta  
CAR : Constitutive Androstane Receptor  
CBX2/M33 : Chromeobox homolog 2  
CDK16 : Voir PCTK1

CGP : Cellule Germinale Primordiale  
CHEK2 : Cell Cycle Checkpoint Kinase 2 homolog  
CIS : Carcinome *In Situ*

## *D*

---

DAX1 : Dosage-sensitive sex reversa, Adrenal hypoplasia critical région on chromosome X gene 1  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DAZL : Deleted in AZoospermia-Like  
DBP : Di-n-Butyl-Phtalate  
DCHP : DiCycloHexyl-Phtalate  
DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane  
DDX4 : DEAD box polypeptide 4  
DEHP : Di-2-EthylHexyl-Phtalate  
DEP : DiEthyl-Phtalate  
DES : DiEthylStilbestrol  
DHH : Desert HedgeHog  
DHT : DiHydroTestostérone  
DiBP : Di-iso-Butyl-Phtalate  
DMP : DiMéthyl-Phtalate  
DMRT1 : Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1  
DnHP : Di-n-Hexyl-Phtalate  
DnPP : Di-n-Propyl-Phtalate  
DOTP : DiOctylTere-Phtalate

## *E*

---

EFSA : European Food Safety Agency  
eNOS : endothélial Nitric Oxyde Synthase  
ER : Estrogen Receptor

## *F*

---

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

Fancl	: Fanconi anemia, complementation group L
FGF9	: Fibroblast Growth Factor 9
FOXL2	: Forkhead box L2
FSC	: Forward Scatter
FSH	: Follicle-Stimulating Hormone

## *G*

---

GATA4	: GATA binding protein 4
GCAP	: Germ Cell Alkaline Phosphatase
gcd	: Germ Cell Deficiency

## *H*

---

hCG	: human Chorionic Gonadotropin
<i>HepG2</i>	: <i>Lignée cellulaire humaine de carcinome hépatique</i>
HMG	: High Mobility Group
HMGCoARed	: HydroxyMethylGlutaryl Coenzyme-A Reductase
HRE	: Hormone Response Element

## *I*

---

IAG	: Indexe Ano-Génital
INSL-3	: Insulin-Like 3
ITGCNU	: Intra-Tubular Germ Cell Neoplasia Unclassified

## *J*

---

jpc	: jours post conception
jpp	: jours post-partum

## *K*

---

<i>KGN</i>	: <i>Lignée cellulaire humaine de carcinome de cellules de la granulosa</i>
------------	---

## L

---

LBD	: Ligand Binding Domain
LH	: Luteinizing Hormone
LHX9	: LIM Homeobox 9
LIF	: Leukemia Inhibiting Factor
LXR	: Liver X Receptor

## M

---

MACS	: Magnetic-Activated Cell Sorting
MAGE-A1	: Melanoma Associated Antigen A1
MAGE-A4	: Melanoma Associated Antigen A4
MAMLD1	: Mastermind-Like Domain-containing protein 1
MBzP	: Mono-Benzyl-Phtalate
<i>MCF-7</i>	: <i>Lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du sein</i>
MDL	: MicroDissection Laser
MEHP	: Mono-EthylHexyl-Phtalat
MMP2	: MetalloProteinase 2

## N

---

NANOG	: Nanog homeobox
NCAM	: Neural Cell Adhesion Molecule
<i>NCI-H295R</i>	: <i>Lignée cellulaire humaine de carcinome surrénalien</i>
NF-κB	: Nuclear Factor-kappa B
NGF	: Nerve Growth Factor
NLS	: Nuclear Localisation Sequence

## O

---

---

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

## P

---

---

PBR	: Peripheral Benzodiazepin Receptor
-----	-------------------------------------

PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCTK1	: PCTAIRE Protein Kinase 1
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDGF $\alpha$	: Platelet-Derived Growth Factor, subunit alpha
PE	: Perturbateur Endocrinien
PGD <sub>2</sub>	: Prostaglandine D <sub>2</sub>
PI3K	: PhosphoInositide 3 Kinase
PLAP	: Placental-Like Alkaline Phosphatase
pog	: <i>Voir Fancl</i>
POU5F1	: POU classe 5 homeobox 1
PPAR	: Peroxysome Proliferator Activated Receptor
PVC	: PolyVinyl Chlorure
PXR	: Pregnan X Receptor

## *R*

---

RA	: Retinoic Acid
RAR	: Retinoid Acid Receptor
RN	: Récepteur Nucléaire
ROS	: Reactive Oxygen Species
RSPO1	: R-Spondin 1
RXR	: Retinoid X Receptor

## *S*

---

SCD1	: Stearoyl Coenzyme-A Desaturase 1
SCF	: Stem Cell Factor
SERKAL	: SEx Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesys syndrome
SF1	: Steroidogenic Factor 1
SHBG	: Sex Hormone Binding Globulin
SHP	: Small Heterodimer Partner
shRNA	: short hairpin RNA
SIDDT	: Sudden Infant Death with Dysgenesis of the Testes
SOX9	: Sry-like HMG-box protein 9

SqEp	: Squalene Epoxydase
SR-B1	: Scavenger Receptor B1
SREBP1c	: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c
SRY	: Sex determining Region on Y chromosome
SSC	: Side Scatter
SSEA1	: Stage-Specific Embryonic Antigen 1
StAR	: Steroid Acute Regulatory protein

## *T*

---

TBS	: Tris Buffer Saline
TDF	: Testis Determining Factor
TDI	: Tolerable Daily Intake
TDS	: Testicular Dysgenesis Syndrome
TGCT	: Testicular Germ Cell Tumor
TGFβ	: Transforming Growth Factor beta
TIMP2	: Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 2
TLDA	: Taqman Low Density Array
TNFα	: Tumor Necrosis Factor alpha
TSPYL1	: Testis Specific Protein Y-Like 1
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

## *V*

---

VASA	: <i>Voir DDX4</i>
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
WNT4	: Wingless-type MMTV integration site family, member 4

## *W*

---

WT1	: Wilms' Tumor 1
-----	------------------

## *Z*

---

ZO-1	: Zona Occludens
------	------------------

$\alpha$

---

$\alpha$ SMA : alpha Smooth Muscle Actin



---

# AVANT-PROPOS

---



La capacité de reproduction, qu'elle soit sexuée ou asexuée, est une fonction fondamentale dans toutes les espèces puisqu'elle permet leur pérennisation. Chez les mammifères, la fonction de reproduction mâle est assurée en grande partie par le testicule, organe complexe qui assure deux rôles majeurs. La spermatogenèse qui consiste à produire des spermatozoïdes fonctionnels à partir de spermatogonies souches, alors que la stéroïdogénèse testiculaire correspond à la production des stéroïdes responsables du développement des organes génitaux internes et externes ainsi que de l'établissement et du maintien des caractères sexuels secondaires.

Ces deux fonctions sont mises en place au cours de la vie fœtale, période clef pour l'établissement d'un système reproducteur fonctionnel à l'âge adulte. En effet, la mise en place du stock de cellules germinales fœtales (gamétogenèse) ainsi que la production de stéroïdes responsables du développement et de la différenciation des organes génitaux sont directement responsables de la capacité de reproduction de l'homme adulte. De ce fait, la complexité et la finesse de la régulation du développement de cet organe, dont l'architecture et les interrelations cellulaires sont essentielles à son bon fonctionnement, font de la vie fœtale une période au cours de laquelle toute perturbation peut avoir de lourdes conséquences.

Or, depuis plusieurs décennies, un grand nombre d'analyses ont mis en lumière, dans les pays industrialisés, une augmentation régulière de l'incidence de plusieurs anomalies de la fonction de reproduction masculine. Ces différentes anomalies sont soupçonnées d'être les multiples symptômes d'un même syndrome de déclin de la fonction de reproduction masculine baptisé « syndrome de dysgénésie testiculaire ». Ce déclin s'inscrit dans une époque où l'industrialisation grandissante et l'apparition de nouveaux matériaux entraînent une augmentation des quantités et de la nature des polluants environnementaux tels que les métaux lourds ou les molécules pouvant perturber le système endocrinien. La question suivante s'est donc posée : *ces polluants environnementaux, vis à vis desquels nous sommes de plus en plus confrontés dans notre vie de tous les jours, peuvent-ils altérer le développement du testicule pendant la vie intra-utérine et ainsi engendrer les anomalies de la fonction de reproduction décrites par les cliniciens?*

C'est pour tenter de répondre à cette question que nous nous sommes intéressés aux effets de deux métaux lourds, le Cadmium et l'Uranium, sur le développement de la gonade humaine. Le laboratoire qui a accueilli mon travail de thèse a en effet, développé une collaboration essentielle avec l'hôpital A. Béclère afin de pouvoir récupérer des échantillons humains issus d'interruption volontaire de grossesse, ce que très peu d'équipes dans le monde

peuvent réaliser. Toutefois, travailler directement sur le fœtus humain est délicat et nécessite impérativement une réflexion éthique. Dans le cas précis de notre étude, ce projet qui trouve toute sa place dans les thématiques de santé publique actuelles, a été soumis au conseil local d'éthique de l'hôpital A. Bécclère avant d'être mis en œuvre.

Les travaux sur la Cadmium ont été publiés en 2010 dans la revue « Environmental Health Perspectives » et nous y démontrons qu'au cours du premier trimestre de la grossesse, ce polluant altère le développement des cellules germinales aussi bien dans la gonade mâle que femelle à des doses environnementales. Concernant nos études sur l'Uranium, la publication de ces données a été récemment acceptée dans la revue « Reproductive Toxicology » où nous avons montré que, de manière similaire au Cadmium, l'Uranium altère le développement des cellules germinales fœtales à la fois dans l'ovaire et le testicule. Dans ces deux études, les travaux ont été réalisés en parallèle sur des gonades fœtales murines, ce qui nous a permis de montrer que les gonades fœtales humaines sont beaucoup plus sensibles que les gonades murines.

Toutefois, dans un souci de linéarité et de clarté, ces travaux ne seront pas développés plus en avant dans ce manuscrit.

Les polluants environnementaux peuvent être présents sous différentes formes de nature très variée. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur une catégorie bien particulière, les phtalates. Ces composés sont en très grande majorité issus de l'industrie du plastique, pour une production dépassant plusieurs millions de tonnes par an à l'échelle mondiale. De très nombreuses études ont démontré l'effet délétère des phtalates sur le développement de la fonction de reproduction de différentes espèces, et plus particulièrement des rongeurs, au cours de la vie fœtale. La toxicité de ces molécules n'est donc plus à démontrer chez l'animal, en revanche, au début de ce travail de thèse, il n'existait que peu d'étude chez l'Homme. Seules quelques études épidémiologiques mettaient en corrélation les taux de phtalates mesurés chez les femmes enceintes et de possibles altérations de la fonction de reproduction chez les nouveaux-nés. Ceci vient ainsi renforcer les suspicions quant à l'impact délétère des phtalates sur le développement du testicule fœtal humain.

Ces données sur l'effet des phtalates ainsi que la très grande multiplicité des sources dans notre environnement ont véritablement transformé cette problématique en une question fondamentale relevant du domaine de la santé publique.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier les effets des phtalates sur le développement du testicule fœtal humain au premier trimestre de la grossesse, période clef du

développement fœtal où se mettent en place ces deux fonctions et qui est connue pour être particulièrement sensible aux polluants environnementaux. Ce travail a été possible grâce à une collaboration établie avec le service de Gynécologie Obstétrique du Pr. René Frydman à l'hôpital A. Bécclère.

Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé l'effet du MEHP, le métabolite actif de l'un des phtalates les plus répandus dans l'environnement, sur le développement des trois types cellulaires majeurs du testicule fœtal : les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

Les premières études que nous avons réalisées ont été effectuées avec une dose de  $10^{-4}$ M, ce qui correspond à une dose relativement élevée. Dans la deuxième partie de ma thèse, il nous a donc paru fondamental d'évaluer les effets du MEHP sur le développement du testicule fœtal pour une dose plus faible à laquelle le fœtus humain peut-être soumis *in utero*.

Enfin, dans la dernière partie de mon travail de thèse, nous nous sommes attachés à décrire les mécanismes d'action du MEHP sur le testicule fœtal humain.

En utilisant une approche de plaques microfluidiques, nous avons analysé les effets du MEHP sur le niveau de transcription des récepteurs nucléaires. La régulation transcriptionnelle n'étant toutefois pas nécessairement le reflet d'une régulation de son activité, nous avons donc analysé l'expression de différents gènes cibles de ces récepteurs après culture en présence ou absence de MEHP, à la fois sur testicule entier et sur cellules isolées. Pour cela, nous avons mis au point une stratégie originale d'isolement des cellules germinales fœtale humaine par FACS.

Les résultats de cette thèse seront présentés dans trois articles successifs.

Dans un premier article, publié dans la revue « Environmental Health Perspectives », nous avons étudié les effets des phtalates sur le développement des différents types cellulaires du testicule fœtal humain en utilisant le modèle de culture organotypique mis au point dans notre laboratoire.

Ce travail est suivi d'un article qui vient d'être soumis à la revue « Biochimie » dans lequel nous nous décrivons l'impact d'une faible dose de phtalates susceptible d'être mesurée dans les fluides biologiques.

Enfin, un dernier article en cours de rédaction résume nos récents résultats sur la recherche des mécanismes d'action qui peuvent être responsables des effets des phtalates sur le développement du testicule fœtal humain.



---

# ETAT DE L'ART

---



La différenciation sexuelle et le développement des organes génitaux internes et externes ainsi que la différenciation des caractères sexuels secondaires interviennent au cours d'une cascade d'événements complexes qui aboutit à la mise en place d'un appareil reproducteur fonctionnel et d'un individu fertile pouvant assurer la pérennisation de son espèce. Ce phénomène prend, chez les mammifères, son origine au stade le plus précoce qui soit. C'est d'abord lors de la fécondation qu'est apporté ou non, le chromosome Y qui confère le sexe génétique de l'embryon. Ce sexe génétique va déterminer le sexe gonadique en orientant la gonade bipotentielle vers une différenciation testiculaire ou ovarienne. Il s'en suit, pendant cette période clef qu'est la vie fœtale, une succession d'événements fondamentaux pour le développement de l'appareil reproducteur. Bien que ces mécanismes soient de mieux en mieux décrits chez la souris, les données sont beaucoup moins nombreuses chez l'Homme. Ce chapitre a pour but de résumer les connaissances actuelles du développement du testicule fœtal humain.

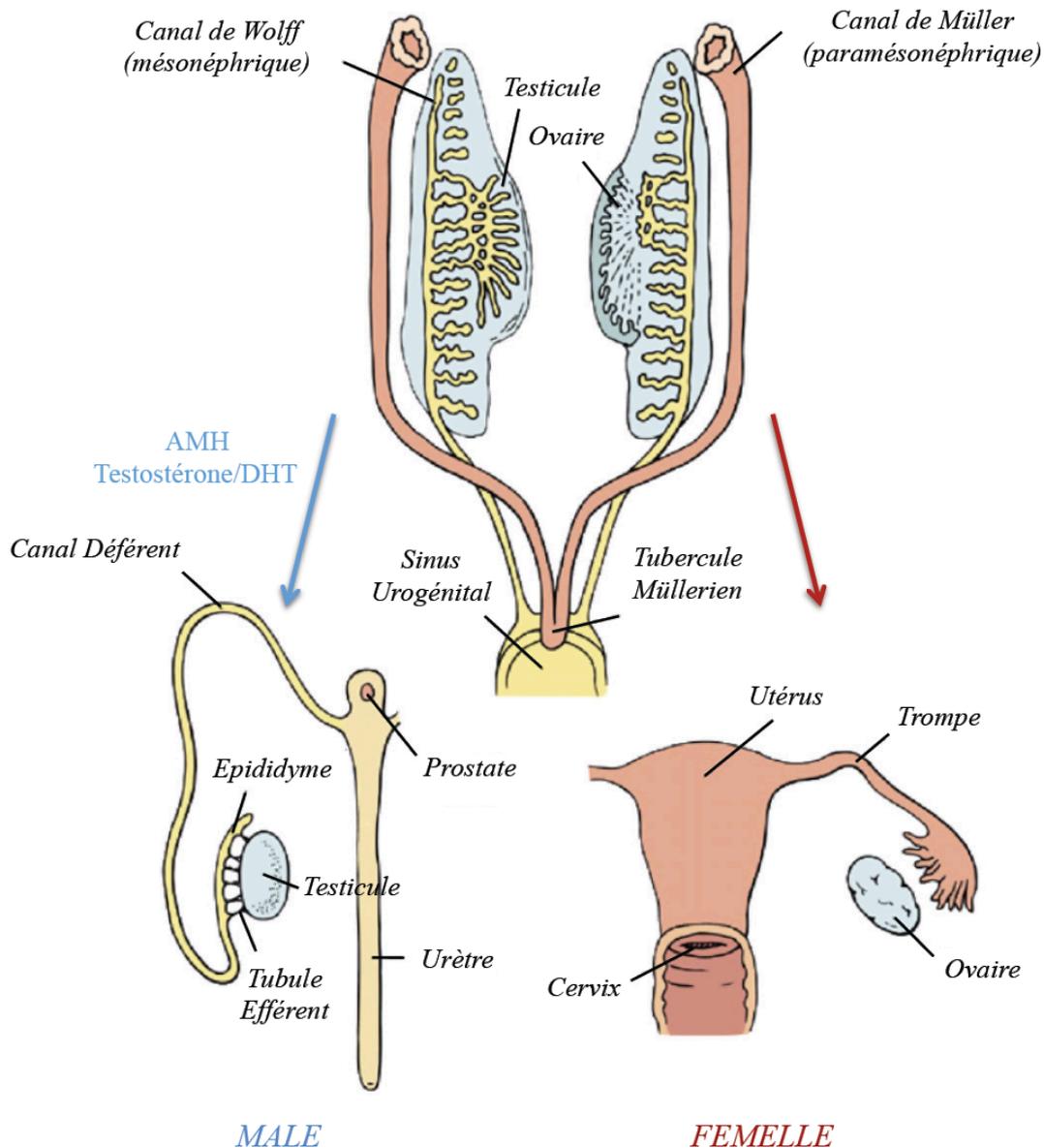
### I. STRUCTURE INDIFFERENCIEE, LA GONADE BIPOTENTIELLE.

---

#### *1.1. Formation de la crête génitale.*

Lors du développement embryonnaire, le mésoderme intermédiaire qui compose la majeure partie de la cavité cœlomique peut être segmenté en trois parties : le pronéphros (qui comprend les glandes surrénales primordiales), le mésonéphros et le métanéphros (partie la plus postérieure, support de la formation des reins). Le mésonéphros contient les structures potentielles pour la différenciation à la fois des voies génitales mâles (canaux de Wolff) et femelles (canaux de Müller). En fonction du sexe, seule une des deux structures se développera (Josso, 1970; Jost and Magre, 1993). Lors de la différenciation sexuelle mâle, les canaux de Müller vont dégénérer sous l'influence de l'AMH (Anti Müllerian Hormone) tandis que les canaux de Wolff vont se développer sous l'action de la testostérone pour donner naissance à l'épididyme, au canal déférent ainsi qu'aux vésicules séminales (Jost and Magre, 1993; George and Wilson, 1994) (Figure 1). La crête génitale, ou gonade bipotentielle, se forme au niveau du mésonéphros et résulte d'un épaissement de l'épithélium cœlomique

combiné à la migration des cellules du mésonephros. Ce processus se déroule aux alentours de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme (George and Wilson, 1994). A ce stade, l'ébauche gonadique est indifférenciée et composée de précurseurs cellulaires qui peuvent indépendamment suivre les deux voies de différenciation mâle et femelle. Chez l'Homme, ce stade indifférencié dure environ 7 à 10 jours (Jirasek, 1971; Rabinovici and Jaffe, 1990).



**Figure 1 : Différenciation du tractus génital humain au cours de la vie fœtale.**

Chez l'Homme, l'AMH produite par les cellules de Sertoli entraîne la régression des canaux de Müller et la testostérone produite par les cellules de Leydig induit le développement des canaux de Wolff. D'après Biason-Lauber 2010.

Les signaux moléculaires qui contrôlent le développement de la gonade bipotentielle sont à l'heure actuelle encore mal décrits, on connaît néanmoins certains gènes dont le rôle est fondamental pour le bon déroulement de ce processus. C'est notamment le cas de *SF1* (Steroidogenic Factor 1) et *WT1* (Wilms' Tumor 1) (Tableau 1).

	LOCALISATION CHROMOSOMIQUE	TYPE DE MUTATION	PHENOTYPE		
			ORGANES GENITAUX INTERNES ET EXTERNES		AUTRES ORGANES
			46XY	46XX	46XX / 46XY
<i>DEVELOPPEMENT DE LA GONADE BIPOTENTIELLE</i>					
<i>WT1</i>	11p3	Perte de fonction	- Rétention des canaux de Müller - Féminisation des caractères sexuels secondaires	Normal	- Tumeur de Wilms - Néphropathie > Syndrome de Denish-Drash > Syndrome de Frasier - Syndrome WAGR
<i>SF1/NR5A1</i>	9q33	Perte de fonction	- Testicule dysgénésique/absent - ambiguïté génitale jusqu'à réversion sexuelle complète > Structures Müllériennes	- Ménopause précoce	- Insuffisance surrénalienne
<i>LHX9</i>	1q31-32	Perte de fonction	Non Décrit	Non Décrit	Non Décrit
<i>GATA4</i>	8p23.1-22	Perte de fonction	- ambiguïté génitale	Normal	- Communication inter-auriculaire
<i>CBX2/M33</i>	17q25	Perte de fonction	- Réversion sexuelle complète > Ovaires contenant des ovocytes > Structures Müllériennes	Non Décrit	Normal

**Tableau 1 : Synthèse des principaux gènes impliqués dans la mise en place de la gonade bipotentielle chez l'Homme.**

Ce tableau liste les principaux gènes, ainsi que le phénotype de leur mutation aux niveaux gonadique et général. D'après Biason Lauber 2010.

*SF1* ou *NR5A1* est un gène qui code pour un membre orphelin de la super famille des récepteurs nucléaires. Chez l'Homme, l'expression de SF1 a été mise en évidence dans la glande surrénale ainsi que dans la gonade indifférenciée dès 32-33 jours post conception (jpc) (Ramayya *et al.*, 1997; Hanley *et al.*, 1999). L'invalidation de *SF1* chez l'Homme entraîne une agénésie gonadique démontrant son implication dans la mise en place de la gonade bipotentielle (Biason-Lauber, 2010). Ce récepteur nucléaire joue un rôle fondamental dans le développement testiculaire dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation. SF1 active l'expression de l'*AMH* dans les cellules de Sertoli ce qui aura pour conséquence la régression des canaux de Müller. De même, à la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation, SF1 est responsable dans les cellules de Leydig de l'activation des enzymes de la stéroïdogénèse ayant pour finalité la synthèse de la testostérone. Les mutations de *SF1* chez l'Homme entraînent un panel de phénotypes allant de

l'ambiguïté génitale à des cas de réversion sexuelle complète avec présence de structures Müllériennes chez des individus XY (Veitia *et al.*, 2001; Lin and Achermann, 2008).

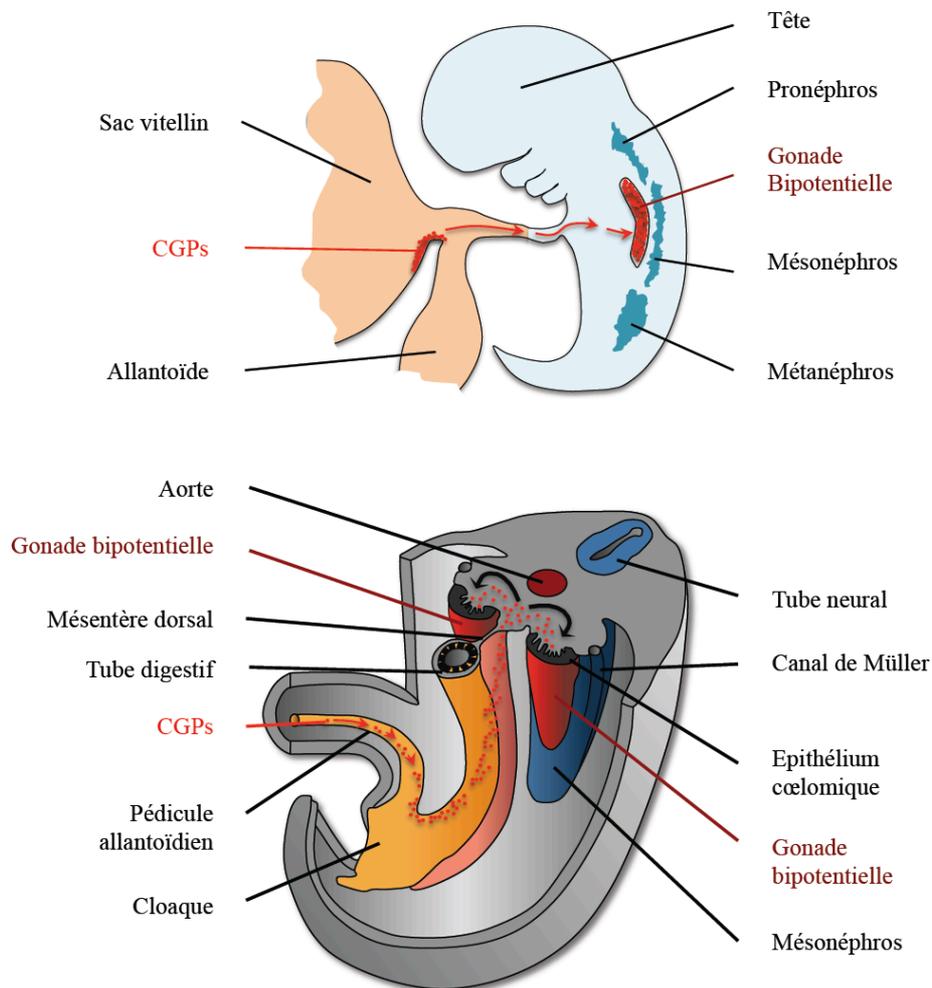
*WT1*, quant à lui, code pour un facteur de transcription à doigt de Zinc dont l'invalidation a été mise en évidence dans un certain nombre de cas de tumeurs de Wilms. La mutation de *WT1* chez l'Homme se traduit par une dysgénésie gonadique (rétention des canaux de Müller et féminisation des caractères sexuels secondaires) avec des cas de néphropathies correspondants aux syndromes de Denish-Drash et de Frasier (Meacham *et al.*, 1991; Veitia *et al.*, 2001) ainsi qu'un syndrome de retard mental (WAGR syndrome).

Outre *SF1* et *WT1*, il existe d'autres gènes impliqués dans l'établissement de la gonade bipotentielle. Notamment *GATA4* (GATA binding protein 4) dont la mutation chez l'Homme entraîne une ambiguïté génitale chez les individus XY. *LHX9* (LIM Homeobox 9) qui peut lier directement le promoteur de *SF1*, semble également être impliqué dans ce processus. De même, la mutation homozygote de *CBX2/M33* (Chromobox Homolog 2) chez l'Homme entraîne une réversion sexuelle complète des individus XY (Biason-Lauber *et al.*, 2009) (Tableau 1). Notons que l'invalidation de ces différents gènes chez la souris se traduit par des cas d'agénésie gonadique et de réversion sexuelle (Luo *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1997; Katoh-Fukui *et al.*, 1998).

## 1.2. Migration des Cellules Germinales Primordiales.

Les cellules germinales primordiales (CGPs), à l'origine du développement de la lignée germinale, apparaissent très tôt au cours du développement (Figure 2). Chez la souris, ces cellules trouvent leur origine au niveau de l'épiblaste proche de l'ectoderme extra-embryonnaire. En ce qui concerne l'espèce humaine, l'origine exacte des CGPs n'a pas été mise en évidence, ces cellules se différencient dans le blastocyste de 4,5 jpc et deviennent détectables lors de leur passage dans le mésoderme extra-embryonnaire puis dans l'endoderme du sac vitellin au tout début de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation (à 22 jpc) avant de migrer dans le pédicule allantoïdien (Jirasek, 1971; Fujimoto *et al.*, 1977). Cette première phase de la migration des CGPs est un phénomène passif résultant principalement de modifications morphologiques conséquentes au développement embryonnaire (Pereda *et al.*, 2006). Les CGPs poursuivent ensuite leur migration de la base du pédicule allantoïdien via l'intestin embryonnaire et le mésentère dorsal jusqu'aux crêtes génitales (Figure 2) selon un processus actif. Chez l'Homme, une récente étude a montré que ces cellules migrent en même

temps que les fibres nerveuses autonomes qui viennent innervent la gonade primordiale. Les CGPs sont retrouvées au centre de ces fibres près des cellules de Schwann et l'ensemble CGPs/fibres nerveuses autonomes arrive au niveau de la gonade pendant la 5<sup>ème</sup> semaine de gestation (entre le 29<sup>ème</sup> et le 33<sup>ème</sup> jpc) (Mollgard *et al.*, 2010). La crête génitale est ainsi entièrement colonisée aux alentours de la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation (Wartenberg, 1989). Pendant leur migration, les CGPs prolifèrent activement et passent de quelques dizaines de cellules dans l'épiblaste à plusieurs milliers à leur arrivée dans la crête génitale (Francavilla *et al.*, 1990).



**Figure 2 : Parcours migratoire des CGPs lors du développement embryonnaire.**

Les CGPs ont une origine extra-embryonnaire, elles apparaissent dans le mésoderme extra-embryonnaire à la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation. Les CGPs migrent ensuite depuis le pédicule allantoïdien via l'intestin primitif avant de coloniser la crête génitale à 6 semaines de gestation chez l'Homme.

## II. DETERMINISME GENETIQUE DE LA DIFFERENCIATION TESTICULAIRE

---

### II.1. *SRY* et l'origine de la différenciation sexuelle

En 1916, Calvin Bridges décrit pour la première fois la notion de chromosomes sexuels chez la drosophile (*Drosophila Melanogaster*), arguant que la détermination du sexe de cette espèce se trouvait sous contrôle du nombre de chromosomes X présents dans le caryotype (Bridges, 1916). Il faut attendre 1959 pour que plusieurs études portant sur les anomalies caryotypiques des chromosomes sexuels chez l'Homme (XXY et XO) fassent émerger l'idée d'une détermination sexuelle liée au chromosome Y (Ford *et al.*, 1959; Jacobs and Strong, 1959) et la notion de locus TDF (Testis Determining Factor) sur ce chromosome.

C'est en étudiant les cas de réversions sexuelles par translocations chromosomiques chez des femmes XY et des hommes XX, que fut mise en évidence une séquence sur le chromosome Y baptisée *SRY* (Sex determining Region on Y chromosome) et identifiée comme le gène responsable de la détermination sexuelle dans le locus du TDF (Palmer *et al.*, 1989; Gubbay *et al.*, 1990). Le rôle de *Sry* fut confirmé chez la souris par son invalidation chez des animaux XY et son intégration dans des animaux XX, entraînant à chaque fois un phénomène de réversion sexuelle (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991).

Localisé à 35kb de la région pseudo-autosomale sur le bras court du chromosome Y, *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). *SRY* est exprimé dans la crête génitale juste avant la formation des cordons séminifères, dès le début de la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme et connaît un pic d'expression aux alentours du 44<sup>ème</sup> jpc. Son expression est maintenue chez l'Homme après la différenciation testiculaire jusqu'à l'âge adulte (Salas-Cortes *et al.*, 1999; Hanley *et al.*, 2000) ce qui diffère des données connues chez la souris (Lovell-Badge, 1993).

### II.2. *Contrôle génétique complexe de la différenciation testiculaire*

Si il est clairement établi que l'expression du gène *SRY* est le moteur de la différenciation testiculaire, la ou les cibles de ce gène sont à l'heure actuelle peu connues. Le doute subsiste en effet, quant à l'existence de multiples cibles moléculaires de *SRY*, ou d'une

cible unique qui aurait la potentialité d'induire seule la différenciation testiculaire (revue dans Wilhelm *et al.*, 2007). Toutefois, plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans la différenciation et le développement de la gonade mâle (revue dans Biason-Lauber, 2010). Nous listerons dans le paragraphe suivant les principaux gènes ainsi que le phénotype de leur mutation chez l'être humain (Tableau 2).

*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). En effet, chez l'Homme, l'expression de *SOX9* a été mise en évidence dans le testicule au niveau des cellules de Sertoli dès 41 à 44 jpc avec un pic d'expression entre 44 et 52 jpc (Hanley *et al.*, 2000). Son expression présente un profil identique à celui de l'expression de *SRY*, alors qu'elle est très faible dans l'ovaire. La mutation de *SOX9* entraîne l'apparition chez l'Homme d'un syndrome de malformation du squelette, la dysplasie campomyélique. Cette maladie est en général associée à une réversion sexuelle chez les patients XY (Wagner *et al.*, 1994). De même la duplication de *SOX9* chez les individus XX entraîne l'apparition d'un phénotype mâle (Huang *et al.*, 1999). *SOX9* est un gène fondamental de la différenciation gonadique, de nombreux travaux laissent penser qu'il pourrait être une cible directe de *SRY*. Premièrement les cellules de Sertoli qui expriment *SOX9* sont les mêmes cellules que celles qui ont exprimé *SRY* (Sekido *et al.*, 2004). Deuxièmement, des travaux réalisés chez la souris ont démontré une régulation directe de *Sox9* par *SRY*. En effet *SRY* agirait en coopération avec *SF1* pour se lier à la séquence régulatrice de *Sox9* et induire son expression. *SOX9* agit ensuite en coopération avec *SF1* pour fixer sa propre séquence régulatrice et maintenir son expression (Sekido and Lovell-Badge, 2008).

*SF1* possède, au delà de son implication dans la mise en place de la gonade bipotentielle, un rôle fondamental dans le développement testiculaire. Dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation, *SF1* active l'expression de l'*AMH* dans les cellules de Sertoli, ce qui aura pour conséquence la régression des canaux de Müller. De même, à la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation, *SF1* est responsable dans les cellules de Leydig de l'activation des enzymes de la stéroïdogénèse et donc de la synthèse de la testostérone. La mutation de *SF1* chez l'Homme entraîne un large panel de phénotypes, allant de l'ambiguïté génitale à des cas de réversion sexuelle complète avec présence de structures Müllériennes chez des individus XY (Veitia *et al.*, 2001; Lin and Achermann, 2008).

	LOCALISATION CHROMOSOMIQUE	TYPE DE MUTATION	PHENOTYPE		
			ORGANES GENITAUX INTERNES ET EXTERNES		AUTRES ORGANES
			46XY	46XX	46XX / 46XY
<i>DEVELOPPEMENT TESTICULAIRE</i>					
<b>SRY</b>	Yp11.3	Perte de fonction	- Dysgénésie testiculaire - ambiguïté génitale/réversion sexuelle complète > Structures Müllériennes	<i>Non Applicable</i>	<b>Normal</b>
<b>SOX9</b>	17q24.3-25.1	Perte de fonction	- Réversion sexuelle - Dysgénésie testiculaire	<b>Normal</b>	- Dysplasie campomyélique
		Duplication	Non Décrit	- Réversion sexuelle	Non Décrit
<b>SFI/NR5A1</b>	9q33	Perte de fonction	- Testicule dysgénésique/absent - ambiguïté génitale/réversion sexuelle complète > Structures Müllériennes	- Ménopause précoce	- Insuffisance surrénalienne
<b>FGF9*</b>	13q12.1	Polymorphisme*	- Réversion sexuelle	Non Décrit	Non Décrit
<b>DMRT1</b>	9q24.3	Perte de fonction	- ambiguïté génitale > Cryptorchidie > Structures Müllériennes	<b>Normal</b>	- Anomalies crano-faciales - Microcéphalie - Retard mental
<b>TSPYL1</b>	6q22-23	Perte de fonction	- Dysgénésie testiculaire - ambiguïté génitale	Non Décrit	- Syndrome SIDDT > Mort subite infantile
<b>DHH</b>	12q13.1	Perte de fonction	- Dysgénésie testiculaire - ambiguïté génitale	<b>Normal</b>	- Polyneurpathie
<b>ATRX</b>	Xp13	Perte de fonction	- Dysgénésie testiculaire - ambiguïté génitale	<b>Normal</b>	- Anomalies psycho-motrice - Thalassémie (liée à l'X) - Dysmorphie faciale
<b>MAMLD1</b>	Xq28	Perte de fonction	- Hypospadias	Non Décrit	- Myopathie myotubulaire

**Tableau 2 : Synthèse des principaux gènes impliqués dans la différenciation testiculaire chez l'Homme.**

Ce tableau liste les principaux gènes nécessaires au développement du testicule fœtal, ainsi que le phénotype de leur mutation aux niveaux gonadique et général. D'après Biason Laubert 2010. \* Dans le cas de FGF9, le phénotype décrit n'est pas associé à la mutation du gène, mais aux différents polymorphismes de sa séquence promotrice.

*FGF9* est un membre de la famille des fibroblast growth factor qui s'exprime spécifiquement au niveau des cordons séminifères au cours de la vie fœtale et qui semble impliqué dans la différenciation sexuelle mâle en aval de *SRY*. Chez l'Homme, son expression a été détectée à 7 semaines de gestation (Ostrer *et al.*, 2007). Aucune mutation de *FGF9* n'a été décrite à ce jour chez l'Homme, néanmoins une étude de microsatellites a mis en évidence une corrélation entre certains polymorphismes des séquences régulatrices de *FGF9* et la

réversion sexuelle de mâle à femelle d'individus 46XY suggérant l'implication de *FGF9* dans la différenciation testiculaire (Chen *et al.*, 2007). Cette même équipe a depuis mis en évidence un contrôle de la synthèse de testostérone murine fœtale par *Fgf9*, pouvant expliquer les phénomènes d'ambiguïtés et de réversions sexuelles chez les patients atteints d'une anomalie de ce gène (Lin *et al.*, 2010b). De plus, les souris XY invalidées pour *Fgf9* meurent à la naissance et présentent un phénotype de réversion sexuelle (Colvin *et al.*, 2001) (Tableau 2).

*DMRT1* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1) est un gène associé aux gènes du déterminisme sexuel de *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*. Ce gène code pour une protéine possédant un domaine de liaison à l'ADN (domaine DM). Chez l'Homme, l'expression de la protéine DMRT1 est exclusivement restreinte au testicule (Moniot *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2000). La monosomie humaine du bras court du chromosome 9, portant le gène *DMRT1*, chez des patients 46XY entraîne l'apparition d'ambiguïtés sexuelles telles qu'une féminisation des organes génitaux externes associée à des cas de cryptorchidie ce qui suggère l'implication de *DMRT1* dans le développement testiculaire (Muroya *et al.*, 2000) (Tableau 2).

Le gène *TSPYL1* (Testis Specific Protein Y-Like 1) code pour une protéine appartenant à la famille des modificateurs de chromatine, principalement impliqués dans l'assemblage du nucléosome responsable de la compaction de la chromatine (Vogel and Schmidtke, 1998; Scherl *et al.*, 2002). Puffenberger et collaborateurs ont décrit l'implication de la mutation humaine de *TSPYL1* dans le syndrome SIDDT (Sudden Infant Death with Dysgenesis of the Testes). Chez les enfants 46XY atteints de cette maladie, on retrouve parmi les symptômes, une dysgénésie testiculaire avec une ambiguïté de l'appareil génital externe, ainsi qu'une déficience en testostérone (Puffenberger *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2006). Il est intéressant de souligner que les enfants XY victimes d'un Sudden Infant Death sans anomalies du développement testiculaire ne portent pas la mutation *TSPYL1* (Hering *et al.*, 2006) (Tableau 2).

Plusieurs autres gènes sont impliqués dans la différenciation sexuelle mâle de la gonade, notamment *DHH* (Desert HedgeHog), *ATRX* (Alpha Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) l'homologue du gène *rad54* chez *S.Cerevisiae*, ainsi que *MAMLD1* (Mastermind-Like Domain-Containing Protein 1). La mutation de ces différents gènes chez l'Homme provoque une dysgénésie gonadique et une réversion sexuelle chez les individus XY (Reardon *et al.*, 1995; Umehara *et al.*, 2000; Fukami *et al.*, 2006) (Tableau 2).

La théorie selon laquelle le développement ovarien serait un développement « par défaut » de la gonade par opposition au développement « induit » du testicule fœtal, a longtemps été considérée comme un dogme. Cependant, il est maintenant clairement admis que l'orientation du développement gonadique vers la voie mâle ou la voie femelle est la résultante d'un subtil équilibre entre l'expression des gènes de développement testiculaire que nous venons de décrire et l'expression de gènes de développement ovarien (Revue dans Kim and Capel, 2006; Wilhelm *et al.*, 2007; Biason-Lauber, 2010). Bien que ces gènes ne soient pas impliqués dans le développement du testicule fœtal, l'interrelation entre développement testiculaire et développement ovarien est fondamentale pour le développement de la fonction de reproduction. Nous aborderons ci-dessous les acteurs majeurs du développement ovarien (Tableau 3).

	LOCALISATION CHROMOSOMIQUE	TYPE DE MUTATION	PHENOTYPE		
			ORGANES GENITAUX INTERNES ET EXTERNES		AUTRES ORGANES
			46XY	46XX	46XX / 46XY
<i>DEVELOPPEMENT OVARIEN</i>					
<b>DAX1/NROB1</b>	Xp21	Perte de fonction	Normal	- Retard de puberté	- Hypoplasie surrénalienne - Hypogonadotropisme
		Duplication	- Testicule dysgénésique ou absent - ambiguïté génitale / réversion sexuelle complète > Structures Müllériennes	Normal	- Fente labio-palatine - Retard mental
<b>WNT4</b>	1p35	Perte de fonction	Non Décrit	- Syndrome SERKAL (ambiguïté génitale) > Présence d'ovotestis ou de testicules > Aplasie des canaux de Müller	- Agénésie renale - Agénésie surrénalienne - Anomalies cardiaques et pulmonaires
		Duplication	- Dysgénésie testiculaire - ambiguïté génitale / réversion sexuelle > Structures Müllériennes	Non Décrit	- Fente labio-palatine - Tétralogie de Fallot - Microcéphalie
<b>RSPO1</b>	1p34.2	Perte de fonction	Normal	- Réversion sexuelle complète - Testicule aspect normal mais stérile	- Hyperkératose palmoplantaire
<b>FOXL2</b>	3q23	Perte de fonction	Normal	- Ménopause précoce	- Syndrome BPES

**Tableau 3 : Synthèse des principaux gènes impliqués dans la différenciation de l'ovaire fœtal humain.**

Ce tableau récapitule les principaux gènes impliqués dans l'orientation de la différenciation gonadique vers le développement ovarien, ainsi que le phénotype de leur mutation aux niveaux gonadique et général. D'après Biason Laubert 2010.

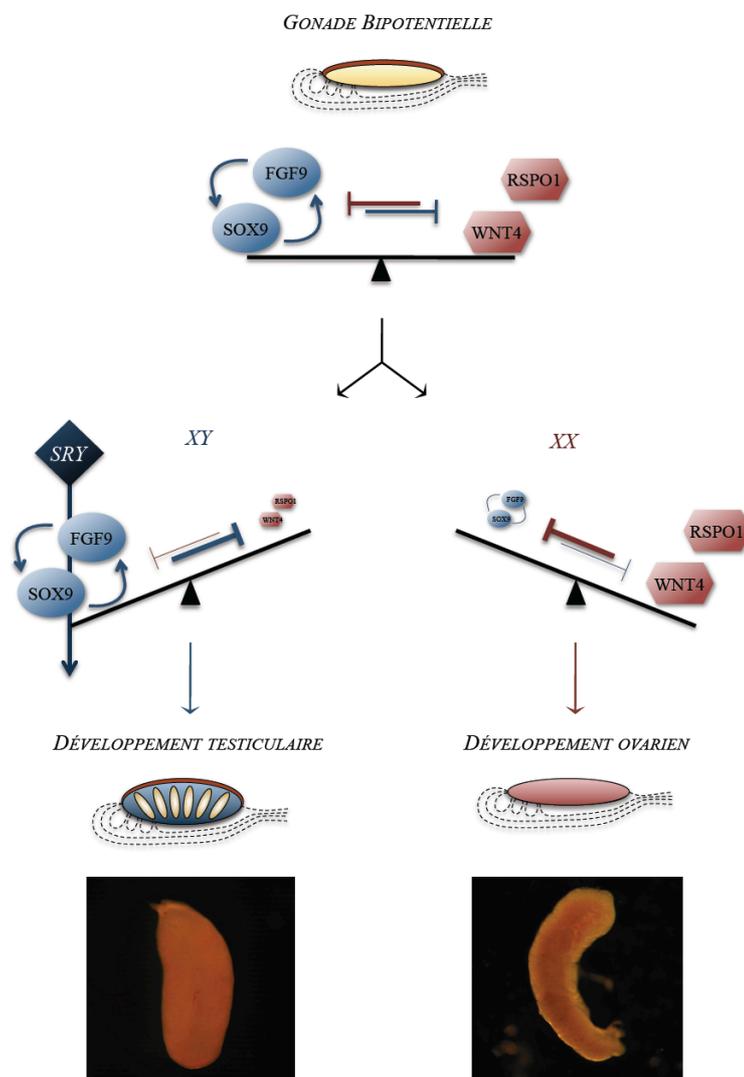
*DAX1* (Dosage-sensitive Sex reversal, adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1) code pour un récepteur nucléaire orphelin (NR0B1) qui possède une séquence en C-terminal présentant une homologie avec le site de liaison des récepteurs nucléaires hormonaux. *DAX1* est exprimé chez l'Homme dès 33 jpc (Hanley *et al.*, 2000) et présente un profil d'expression parallèle à celui de *SFI* (Hanley *et al.*, 1999). La mutation perte de fonction de *DAX1* chez l'Homme entraîne une insuffisance surrénalienne, c'est à dire une déficience en glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes (McCabe, 2001). Ces mutations peuvent également être la cause d'hypogonadisme hypogonadotrope, en raison de l'expression forte de *DAX1* dans l'hypophyse et l'hypothalamus. Enfin, la duplication de la région p21 du chromosome X portant la séquence de *DAX1* entraîne une réversion sexuelle chez les individus XY (Bardoni *et al.*, 1994; McCabe, 2001) (Tableau 3).

*WNT4* (Wingless-type MMTV integration site family, member 4) est un membre de la famille des WNTs, ces protéines agissent via le récepteur de surface Frizzled pour bloquer la dégradation de la  $\beta$ -Caténine. Ce blocage permet l'activation des gènes WNT-dépendants (Nusse, 2003). *WNT4* est exprimé dans les cellules somatiques de l'ovaire fœtal (dans les cellules pré-granulosa) où il induit l'expression de *DAX1* ce qui bloque l'activité de SF1 et inhibe l'activation des enzymes de la stéroïdogénèse (Jordan *et al.*, 2001). Chez l'Homme, un cas de surexpression de *WNT4*, induite par une duplication du bras court du chromosome 1 qui porte ce gène, a été décrite chez un patient 46XY présentant une ambiguïté de l'appareil génital, un hypospadias prononcé ainsi que la présence de résidus à la fois des canaux de Müller et des canaux de Wolff (Jordan *et al.*, 2001). A l'inverse, la mutation homozygote de *WNT4* chez des individus XX provoque l'apparition du syndrome SERKAL (SEx Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesis) qui se traduit entre autres, par une réversion sexuelle femelle/mâle caractérisée par une ambiguïté de l'appareil génital externe et un développement de la gonade allant de l'ovotestis au testicule normalement développé (Mandel *et al.*, 2008) (Tableau 3).

*RSPO1* (R-spondine 1) fait également partie des gènes impliqués dans le développement ovarien. Cette protéine appartient à la catégorie des thrombospondines mais ne possède pas la capacité d'être sécrétée, propriété classique de cette famille. RSPO1 est suspectée d'agir en synergie avec WNT4 pour stabiliser la  $\beta$ -caténine dans la gonade XX (Parma *et al.*, 2006). La mutation du gène codant pour la R-spondine entraîne une réversion sexuelle femelle/mâle chez l'Homme. Ces individus possèdent des testicules normalement développés ainsi qu'une masculinisation complète des organes génitaux internes et externes

(Parma *et al.*, 2006). Toutefois, l'inactivation de *RSPO1* provoque une stérilité de ces patients (Tableau 3).

*FOXL2* qui code pour un facteur de transcription fkh (forkhead/winged hélix), a été mis en évidence par l'analyse de sa mutation qui, chez l'Homme, est responsable du syndrome BPES (Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus inversus Syndrome) de type II. Ce syndrome s'accompagne, en plus des anomalies cranofaciales caractéristiques, d'une ménopause précoce (Beysen *et al.*, 2004). *FOXL2* est, chez les vertébrés, un des marqueurs les plus précoces de la différenciation ovarienne (Cocquet *et al.*, 2002; Veitia, 2010) (Tableau 3).



**Figure 3 : Balance de la régulation du déterminisme sexuel de la gonade fœtale.**

Chez le mâle, SRY entraîne l'activation de la boucle SOX9-FGF9 et induit la différenciation testiculaire. Chez la femelle, en l'absence de SRY, WNT4 et RSPO1 inhibent les gènes mâles et induisent la différenciation ovarienne. D'après Kim *et al.* 2006 et DiNapoli *et Capel* 2008.

Ainsi, les premières étapes de la différenciation sexuelle résultent d'un équilibre subtil entre l'expression de gènes de la différenciation mâle et de gènes de la différenciation femelle (Figure 3). Chez le mâle, l'expression de *SRY* va déséquilibrer cette balance du déterminisme sexuelle et induire la différenciation testiculaire (Figure 3). Une fois la différenciation sexuelle engagée dans la voie mâle, la crête génitale va se développer pour donner naissance au testicule fœtal. Ce développement testiculaire nécessite la mise en place des différents types cellulaires nécessaires à l'architecture ainsi qu'aux fonctions spécifiques de cet organe.

### III. MISE EN PLACE ET CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES

On peut arbitrairement découper le testicule fœtal en deux compartiments cellulaires que sont tout d'abord les cellules germinales, futurs supports de la transmission de l'information génétique à la descendance et les cellules somatiques dont les rôles sont multiples aussi bien dans le support des cellules germinales que dans les sécrétions hormonales qui commandent la différenciation des caractères sexuels primaires.

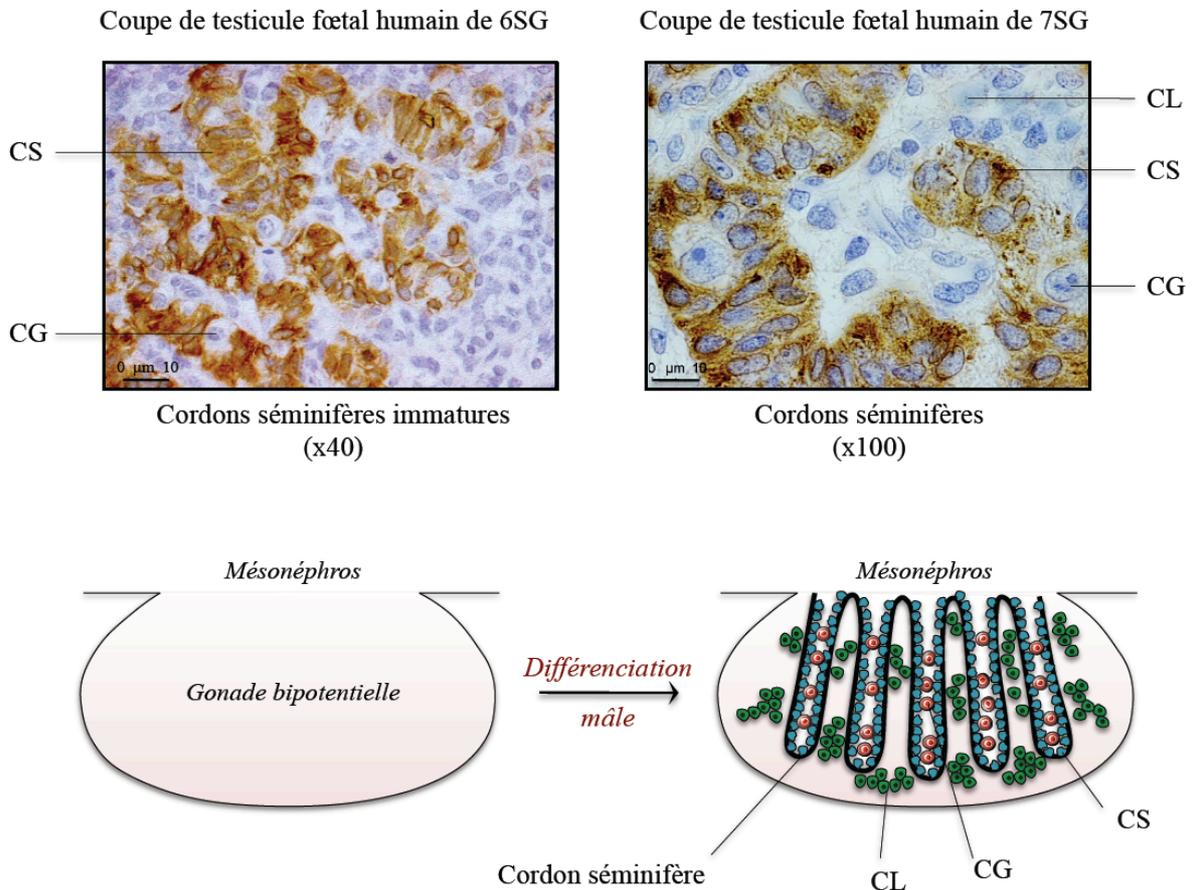
#### III.1. Les cellules somatiques du testicule, support de l'architecture testiculaire

##### III.1.1 Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont les premières cellules à se différencier au sein de la gonade bipotentielle. Ces cellules dérivent de l'épithélium cœlomique (Karl and Capel, 1998) et expriment *SRY* vers le 41-44<sup>ème</sup> jpc chez l'Homme (Koopman *et al.*, 1990; Hanley *et al.*, 2000). L'expression de *SRY* est immédiatement suivie dans ces cellules par l'expression de *SOX9* caractéristique de la différenciation des cellules de Sertoli (Wilhelm *et al.*, 2005). Cette stimulation de l'expression de *SOX9* va ensuite entraîner l'activation de différents facteurs tels que FGF9 et la prostaglandine D2 (PGD<sub>2</sub>) ce qui contribue à la différenciation des cellules de Sertoli (Piprek, 2010).

Au cours de leur différenciation, les cellules de Sertoli vont s'agréger autour des cellules germinales pour former, avec les cellules périvitubulaires myoïdes, les cordons séminifères du testicule qui se développeront ensuite en tubes séminifères chez l'adulte (Figure 4). Cette agrégation a lieu entre la 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> semaine de gestation (i.e. entre 43 et 50

jpc) chez l'Homme (Jirasek, 1971; Wartenberg, 1989). La migration des cellules du mésonéphros est un facteur essentiel au développement des cordons séminifères (Buehr *et al.*, 1993). L'origine exacte des cellules de Sertoli n'est pas clairement connue chez l'Homme, néanmoins les expériences de Pereda et collaborateurs suggèrent une origine plutôt de l'épithélium cœlomique que du mésonéphros (Pereda *et al.*, 2006).

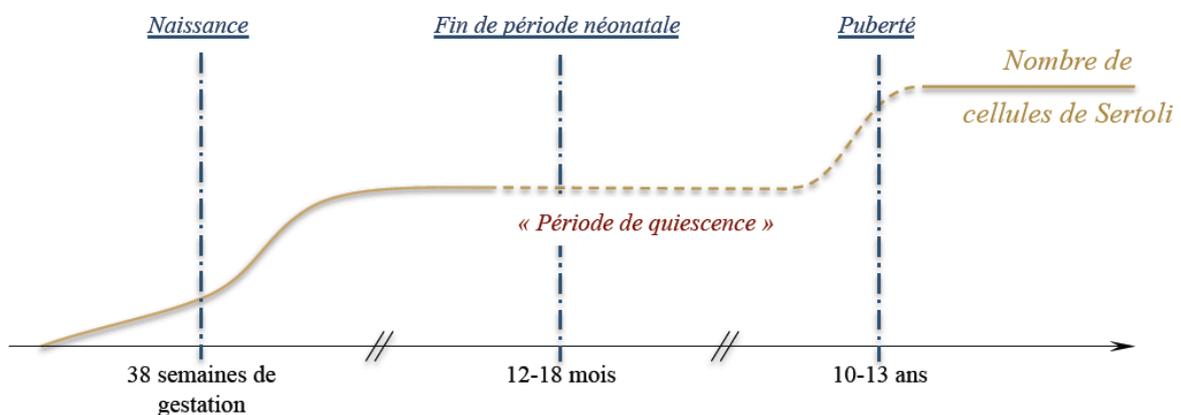


**Figure 4 : Formation des cordons séminifères au cours du développement.**

Entre la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, les cellules de Sertoli (CS) issues de l'épithélium cœlomique, et visibles ici en marron après immunorévélation de l'AMH, vont s'agréger autour des cellules germinales (CG) afin de constituer la structure des cordons séminifères. Les cellules de Leydig (CL) fœtales se retrouvent alors dans le tissu interstitiel entre les cordons. D'après Sharpe 2006.

Pendant la vie fœtale et périnatale, le nombre de cellules de Sertoli augmente fortement en raison d'une prolifération active de ces cellules. Chez l'Homme il existe deux phases de prolifération des cellules de Sertoli : une première phase au cours de la vie fœtale et une deuxième phase qui a lieu au moment de la puberté. Ces deux phases sont séparées par une période de « quiescence » (Sharpe *et al.*, 2003) (Figure 5). Plusieurs études ont montré

que le nombre de cellules de Sertoli augmente au premier trimestre de la grossesse (Bendsen *et al.*, 2003) ainsi qu'au début du deuxième trimestre de 11 à 16 semaines de gestation (O'Shaughnessy *et al.*, 2007). De même, la quantification du nombre de cellules de Sertoli entre le troisième trimestre de la grossesse et la période post-natale démontre un accroissement de ce nombre et par conséquent une forte prolifération de ces cellules en fin de vie fœtale (Cortes *et al.*, 1987). Corroborant cette forte augmentation du nombre de cellules de Sertoli pendant la vie fœtale, les données d'analyses de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) mettant en évidence la fragmentation de l'ADN, ont montré que ces cellules présentaient un faible taux d'apoptose (pourcentage inférieur à 2%) (Berensztein *et al.*, 2002; Helal *et al.*, 2002).



**Figure 5 : Evolution du nombre de cellules de Sertoli humaines au cours de la vie fœtale et post-natale.**

Les cellules de Sertoli présentent deux forts pics de prolifération en fin de vie fœtale et à la puberté. D'après Sharpe *et al.* 2003.

Pendant cette phase du développement fœtal, les cellules de Sertoli expriment différentes molécules qui leur sont spécifiques et qui ont un rôle important pour le développement correct du testicule (revue dans Sharpe *et al.*, 2003).

L'*AMH* est un des gènes très précocement activés dans les cellules de Sertoli juste après leur différenciation (Josso *et al.*, 2006). Induite sous l'action de SOX9 et SF1 (Arango *et al.*, 1999; Josso *et al.*, 2006), son expression protéique est détectable chez l'Homme dès la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation au moment de la formation des cordons séminifères (Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999; Lambrot *et al.*, 2006b). Cette glycoprotéine membre de la super-famille du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) est responsable de la régression des canaux de Müller à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation (Josso *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 2004). Son

expression reste élevée tout au long de la vie fœtale et néonatale, puis diminue à la puberté au moment où les cellules de Sertoli se différencient définitivement (Tran *et al.*, 1987; Baker and Hutson, 1993; Rey *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996; Grinspon and Rey, 2010).

La cytokératine 18 est un marqueur des filaments intermédiaires caractéristique des cellules épithéliales, ce qui inclut les cellules de Sertoli. Chez l'Homme son expression est très forte au premier trimestre puis s'éteint au delà de la 20<sup>ème</sup> semaine (Franke *et al.*, 2004). Chez l'adulte la cytokératine 18 est un marqueur des tubules séminifères dans lesquels les cellules de Sertoli ne sont pas devenues matures (Steger *et al.*, 1996; Maymon *et al.*, 2000), c'est également un marqueur de la dédifférenciation de ces cellules (Steger *et al.*, 1996).

La transferrine est une protéine exprimée chez l'Homme dans le testicule par les cellules de Sertoli dès la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation (Balboni *et al.*, 1995) et dont le rôle serait d'acheminer le fer vers les cellules germinales.

L'inhibine et l'activine sont des glycoprotéines appartenant à la famille du TGF- $\beta$ , responsables de la régulation de la sécrétion de FSH (Follicle-Stimulating Hormone) par la glande hypophysaire (Vale *et al.*, 1988). L'inhibine est formée de la sous unité  $\alpha$  et de l'une des deux sous unités  $\beta$  possibles ( $\beta_A$  ou  $\beta_B$ ). Les trois combinaisons possibles formées par l'association des sous unités  $\beta$  entre elles sont appelées activine A, B et AB. Chez le fœtus humain, au cours du deuxième trimestre, les cellules de Sertoli expriment les sous unités  $\alpha$  et  $\beta_B$ , ce qui indique qu'elles peuvent sécréter à la fois l'inhibine et l'activine. Les cellules de Leydig possèdent le même profil d'expression (Anderson *et al.*, 2002). Le récepteur ActRIIA de l'activine est exprimé dans les cellules germinales et les cellules interstitielles alors que le récepteur ActRIIB est exprimé largement dans tout le testicule. Le récepteur de l'inhibine, le  $\beta$ -glycane, est lui synthétisé dans les cellules périlitubulaires (Anderson *et al.*, 2002). Les rôles exacts de l'activine et de l'inhibine dans le testicule fœtal humain restent néanmoins inconnus.

L'expression nucléaire du récepteur des androgènes est également un marqueur de la maturation des cellules de Sertoli humaines (Suarez-Quian *et al.*, 1999). En effet, au premier trimestre de la gestation, le récepteur aux androgènes n'est pas exprimé dans les cellules de Sertoli alors qu'on le trouve dans les cellules de Leydig et les cellules périlitubulaires (Gaskell *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2005; Boukari *et al.*, 2009). Chez l'adulte, il est détecté non seulement dans les cellules de Leydig et les cellules périlitubulaires mais également dans les cellules de Sertoli, ainsi son expression serait représentative de la différenciation finale de ces cellules. De plus, une anomalie de la maturation des cellules de Sertoli peut-être associée chez l'Homme à l'absence d'expression du récepteur des androgènes (Regadera *et al.*, 2001).

Les cellules de Sertoli jouent un rôle fondamental dans la survie des cellules germinales, et à l'âge adulte dans la production spermatique. Johnson et collaborateurs ont démontré en 1984 un lien linéaire direct entre la production spermatique journalière et le nombre de cellules de Sertoli (Johnson *et al.*, 1984; Petersen and Soder, 2006), ces cellules peuvent en effet supporter un nombre fixe de cellules germinales (Orth *et al.*, 1988). De même, au cours de la vie fœtale, la cellule de Sertoli sert de support au développement des cellules germinales ainsi qu'à leur différenciation (Sharpe *et al.*, 1999). Un développement correct des cellules de Sertoli est, par voie de fait, un critère essentiel au développement des cellules germinales ainsi qu'à la fonction de reproduction de l'individu adulte. Il devient dès lors évident que toute étude intéressée au développement des cellules germinales, doit nécessairement comprendre les mécanismes des interactions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

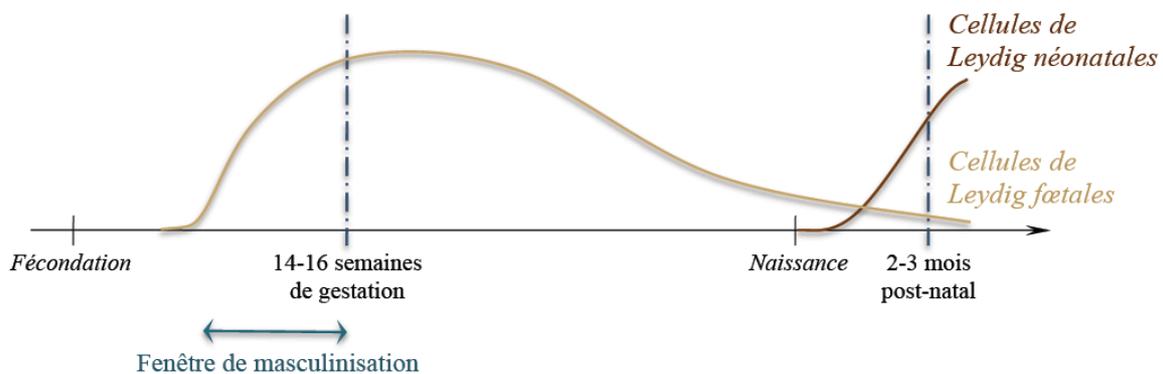
### *III.1.2 Les cellules de Leydig*

Cette population cellulaire est le deuxième type cellulaire majeur du compartiment des cellules somatiques, identifiée en 1850 par Franz Leydig (von Leydig, 1850). Chez l'Homme, ces cellules se différencient à partir de progéniteurs mésenchymateux et deviennent identifiables par immunorévélation de la 3 $\beta$ HSD (3- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase) (Niemi *et al.*, 1967) au cours de la vie fœtale. Ce phénomène a lieu autour de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation (entre 50 et 55 jpc) dans le tissu interstitiel entre les cordons séminifères (Rabinovici and Jaffe, 1990; O'Shaughnessy *et al.*, 2006; Ostrer *et al.*, 2007). Dans ces cellules progénitrices, un accroissement du volume du cytoplasme est observé notamment en raison du développement du réticulum endoplasmique lisse, de l'augmentation du nombre et de la taille des mitochondries et de l'accumulation de gouttelettes lipidiques nécessaires à la synthèse des stéroïdes (Pelliniemi and Niemi, 1969). La maturation fonctionnelle de ces cellules doit néanmoins s'amorcer plus précocement car la production de testostérone est mesurable dès 6 à 7 semaines de gestation (Reyes *et al.*, 1973; Tapanainen *et al.*, 1981; Lambrot *et al.*, 2006b).

Chez tous les mammifères, il existe au moins deux populations temporellement différenciables de cellules de Leydig : les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Leydig adultes, qui présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes (revue dans Habert *et al.*, 2001; O'Shaughnessy and Fowler, 2011). Les cellules de Leydig

foetales sont responsables de la production des androgènes nécessaires à la masculinisation du fœtus ainsi qu'à la descente testiculaire sous l'action combinée de la testostérone et de l'INSL-3 (Insulin Like-3). Ces cellules sont remplacées après la naissance par la seconde population de cellules de Leydig. Ces cellules sont responsables de la production de testostérone nécessaire à la puberté ainsi qu'au démarrage et maintien de la spermatogénèse pendant toute la vie de l'individu (O'Shaughnessy *et al.*, 2006).

Les deux populations de cellules apparaissent séparément et sont morphologiquement dissemblables, la possibilité d'une origine commune des précurseurs de ces deux populations est à ce jour toujours inconnue (Griswold and Behringer, 2009). Chez certains mammifères incluant l'être humain, certains travaux soulèvent l'hypothèse d'une troisième population de cellules de Leydig « néonatale » (Prince, 2001) qui serait responsable du pic de testostérone observable à 2-3 mois post-naissance dont le rôle exact n'a pas encore été élucidé. Toutefois, des doutes subsistent quant à savoir si cette population de cellules néonatales représente une population distincte ou une simple réactivation des cellules de Leydig foetales (O'Shaughnessy and Fowler, 2011).



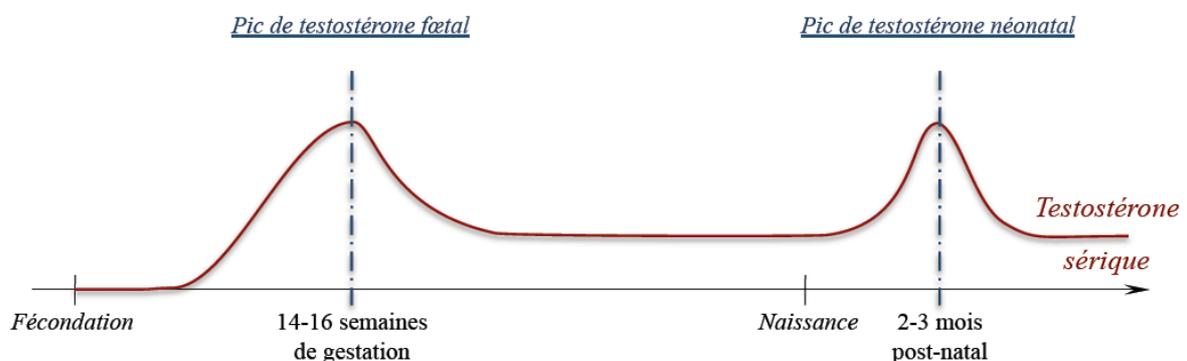
**Figure 6 : Evolution du nombre de cellules de Leydig au cours de la vie fœtale et néonatale.**

Chez l'Homme, le nombre de cellules de Leydig foetales est maximal aux alentours de la 14<sup>ème</sup> semaine de gestation puis diminue progressivement. Les cellules de Leydig foetales sont remplacées par les cellules de Leydig néonatales environ 2 à 3 mois après la naissance. D'après Prince 2001; O'Shaughnessy et Fowler 2011.

L'évolution du nombre de cellules de Leydig au cours du développement est relativement bien connue chez l'Homme (Figure 6). Les cellules de Leydig se différencient et prolifèrent fortement jusqu'aux alentours de la 14<sup>ème</sup> semaine (Baker *et al.*, 2006), elles occupent 50% du volume du testicule, puis le nombre de ces cellules reste stationnaire jusqu'à la 24<sup>ème</sup> semaine. Par la suite, elles dégèrent et leur volume décroît. Après la naissance,

elles connaîtront une nouvelle phase de croissance au moment où apparaissent les cellules de Leydig néonatales au 2-3<sup>ème</sup> mois (Codesal *et al.*, 1990; Prince, 2001) avant de décroître à nouveau jusqu'à la puberté et la mise en place des cellules de Leydig adultes.

La différenciation des cellules de Leydig fœtales est un phénomène très régulé sous l'influence d'un grand nombre de facteurs paracrines. On trouve des facteurs produits par les cellules de Sertoli, qui vont agir sur la différenciation des cellules de Leydig. C'est entre autres le cas de DHH et PDGF $\alpha$  (Platelet-Derived Growth Factor subunit alpha) qui agissent sur la différenciation initiale des cellules de Leydig et dont la mutation chez l'Homme entraîne un dysgénésie gonadique partielle ou complète (Brennan and Capel, 2004; Ross and Capel, 2005).

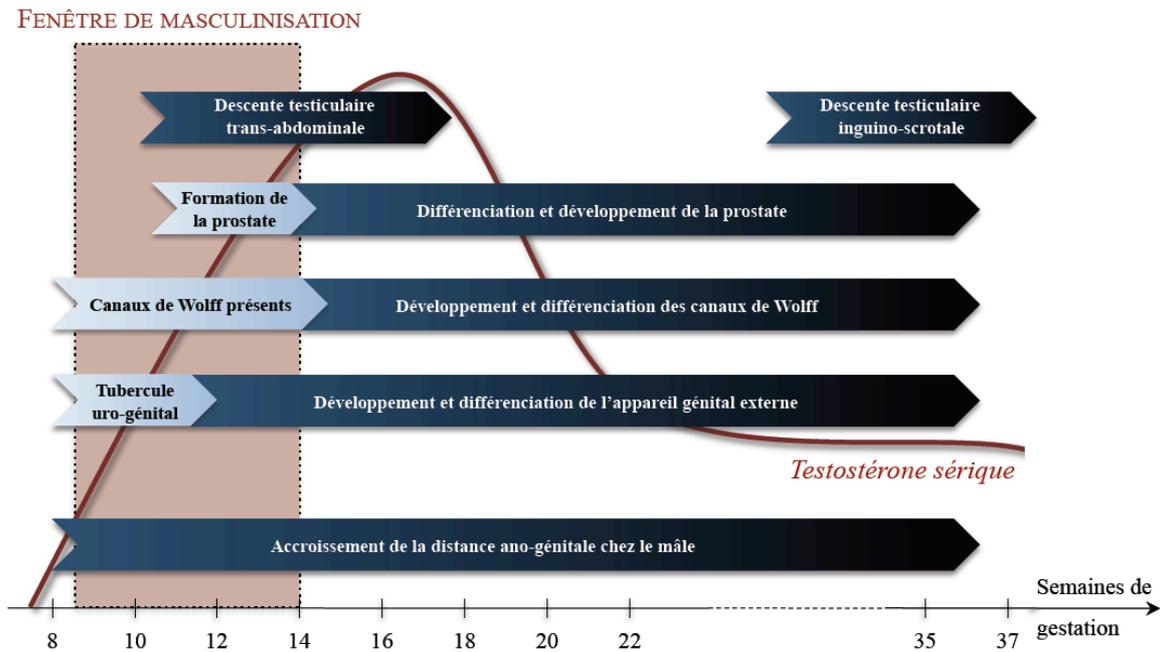


**Figure 7 : Variations des niveaux de testostérone sérique pendant la vie fœtale et néonatale.**

Chez l'Homme, la production de testostérone connaît deux pics. Un premier pendant la vie fœtale à 14-16 semaines de gestation, et un deuxième durant la vie néonatale, 2 à 3 mois après la naissance. D'après O'Shaughnessy et Fowler 2011.

La production de testostérone au cours de la vie fœtale est responsable de la masculinisation du tractus génital et notamment du développement des canaux de Wolff ainsi que de la descente testiculaire (différenciation du gubernaculum). Cette production varie au cours de la vie fœtale et peut être grossièrement séparée en deux phases (Figure 7). Une première phase de forte croissance de la production de testostérone qui s'amorce aux alentours de la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme et qui se traduit par un pic de testostérone dans le sérum entre la 14<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine de gestation. Cette phase particulière jouerait un rôle critique dans la masculinisation du fœtus, car elle se situe dans la « fenêtre de masculinisation ». Cette fenêtre a été décrite chez le rat par Welsh et collaborateurs, qui se sont ensuite basés sur différents critères du développement testiculaire

pour l'extrapoler à la période allant de la 8<sup>ème</sup> à la 14<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme (Welsh *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2009) (Figure 8). La deuxième phase fœtale correspond à une diminution du taux de testostérone circulant de la 18<sup>ème</sup> à la 22<sup>ème</sup> semaine suivie d'une stagnation jusqu'à 2-3 mois après la naissance, âge où se produit un pic de testostérone transitoire (Figure 7).



**Figure 8 : Fenêtre de masculinisation au cours du développement fœtal.**

Chez le fœtus humain, la fenêtre se situe entre 8 et 14 semaines de gestation, au moment de l'augmentation de la production de testostérone. Cette fenêtre est fondamentale pour le développement et la masculinisation de l'appareil génital interne et externe. D'après Welsh *et al.* 2008

La deuxième grande fonction des cellules de Leydig fœtales consiste en la production de l'INSL-3 (Insulin-like-3), une hormone peptidique très conservée chez les différents mammifères (Ivell and Bathgate, 2002) qui est impliquée dans la descente testiculaire. Cette descente testiculaire se sépare en deux phases. La première phase de descente trans-abdominale débute, chez l'Homme, pendant le premier trimestre de la grossesse et se poursuit au second. Cette phase est sous le contrôle de l'INSL-3. Elle est suivie au troisième trimestre d'une phase de descente inguino-scrotale sous contrôle androgénique (revue dans Ivell and Hartung, 2003). La production d'INSL-3 est activée dans les cellules de Leydig sous l'action du récepteur nucléaire NR5A1 (SF1) (Sadeghian *et al.*, 2005; Tremblay and Robert, 2005) ainsi que par la testostérone elle-même (Lague and Tremblay, 2008). Chez le fœtus humain,

l'expression du transcrit et de la protéine de l'INSL-3 est largement détectable dès le début du second trimestre de la grossesse (Anand-Ivell *et al.*, 2008; Bay *et al.*, 2008).

Le développement des cellules de Leydig est sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire pendant la vie fœtale. Néanmoins, dans un grand nombre d'espèces animales, y compris chez l'Homme, il existe une première phase très précoce de développement pendant laquelle les cellules de Leydig sont probablement indépendantes des gonadotrophines et qui coïncide avec le tout début de la fenêtre de masculinisation du fœtus (Welsh *et al.*, 2008). La LH (Luteinizing Hormone) devient détectable dans le sérum à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, donc bien après la première détection de production de testostérone (Reyes *et al.*, 1989). Toutefois, il existe chez l'Homme une autre hormone gonadotrope, l'hCG (human Chorionic Gonadotropin) produite par le placenta, et qui possède une fonction similaire à la LH étant donné qu'elle agit sur le même récepteur (RLHCG). L'hCG est produite par le placenta dès la 1<sup>ère</sup> semaine post fécondation et présente un pic autour de la 10<sup>ème</sup> semaine (Fowler *et al.*, 1998). Le taux d'hCG chute ensuite vers la 12<sup>ème</sup> semaine en parallèle de la première détection de la LH (Clements *et al.*, 1976; Fowler *et al.*, 2009). Le fait que les variations de la production de testostérone coïncident avec les variations de taux d'hCG soulève l'hypothèse d'un contrôle de la production d'androgènes des cellules de Leydig par l'hCG en absence de LH au premier trimestre de la grossesse (Fowler *et al.*, 2009). Néanmoins plusieurs éléments viennent étayer l'hypothèse inverse. Premièrement la présence du récepteur commun à la LH et l'hCG est détectée chez le fœtus humain autour de la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation avec une capacité de liaison maximale entre la 15<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation, soit bien après le début de la production de testostérone (Molsberry *et al.*, 1982; O'Shaughnessy *et al.*, 2007). Deuxièmement, l'étude de patients atteints d'une mutation du gène codant pour le récepteur de la LH/hCG (Kremer *et al.*, 1995) montre un développement partiel du canal déférent et de l'épididyme, mais un développement féminin des organes génitaux externes. Ceci démontre que certaines cellules de Leydig se sont différenciées chez ces individus et ont produit de la testostérone ayant permis un début de la masculinisation des canaux de Wolff de façon hCG indépendante. De même les cas de mutation perte de fonction chez l'Homme de la sous-unité  $\beta$  de la LH entraînent un développement testiculaire correct jusqu'à la naissance mais l'incapacité d'un développement post-natal et pubertaire des organes génitaux (revue dans O'Shaughnessy and Fowler, 2011). De plus, la LH, dont les concentrations plasmatiques sont maximales à 22-24 semaines, doit également intervenir en fin de vie fœtale puisque le nombre et l'activité des cellules de

Leydig sont réduits chez les fœtus anencéphales en fin de grossesse (Rabinovici and Jaffe, 1990). L'ensemble de ces données montre une indépendance aux gonadotropines de la première phase de développement mais également le caractère indispensable des hormones gonadotropes dans la deuxième phase du développement, notamment lors de la masculinisation des organes génitaux.

### III.1.3 Cellules péricubulaires myoïdes et autres cellules interstitielles :

Outre les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli qui représentent les types cellulaires majeurs du compartiment somatique, il existe également d'autres populations cellulaires dont l'importance n'est pas à négliger, mais pour lesquelles peu de données sont connues chez l'Homme.

Les cellules péricubulaires myoïdes dérivent du mésonéphros au moment de la formation de la gonade. Ces cellules forment une assise cellulaire d'épaisseur autour des cellules de Sertoli et interviennent dans la formation des cordons séminifères. En effet chez la souris, des gonades XY cultivées en absence de mésonéphros (donc sans cellules péricubulaires) ne développent pas de cordons séminifères (Buehr *et al.*, 1993) et inversement, dans des gonades XX cultivées en présence d'un mésonéphros XY, des structures semblables à des cordons séminifères et exprimant des marqueurs sertoliens apparaissent (Tilman and Capel, 1999). Les cellules péricubulaires myoïdes expriment l' $\alpha$ SMA ( $\alpha$  Smooth Muscle Actin) de par leur fonction de cellules musculaires lisses, néanmoins aucun marqueur spécifique de cette population cellulaire n'a été décrit (Wilhelm *et al.*, 2007). Chez l'Homme, ces cellules sont décrites comme le principal type cellulaire exprimant le récepteur des androgènes et ce dès le premier trimestre de gestation (Shapiro *et al.*, 2005; Chemes *et al.*, 2008; Boukari *et al.*, 2009).

On trouve également au sein du testicule fœtal (et plus particulièrement du tissu interstitiel) des fibroblastes, des cellules hématopoïétiques (lymphocytes, macrophages, cellules plasmiques, etc.) ainsi que des cellules endothéliales. Ces dernières dérivent également du mésonéphros et vont constituer la vascularisation spécifique de la gonade fœtale mâle (Martineau *et al.*, 1997).

### III.2. La lignée germinale

Si l'ensemble des cellules somatiques du testicule assure une fonction de structure de l'architecture de la gonade ainsi qu'une fonction endocrine fondamentale pour le développement, les cellules germinales fœtales et notamment la mise en place de ces dernières seront en grande partie responsables du pool de spermatogonies souches et donc de la fertilité à l'âge adulte.

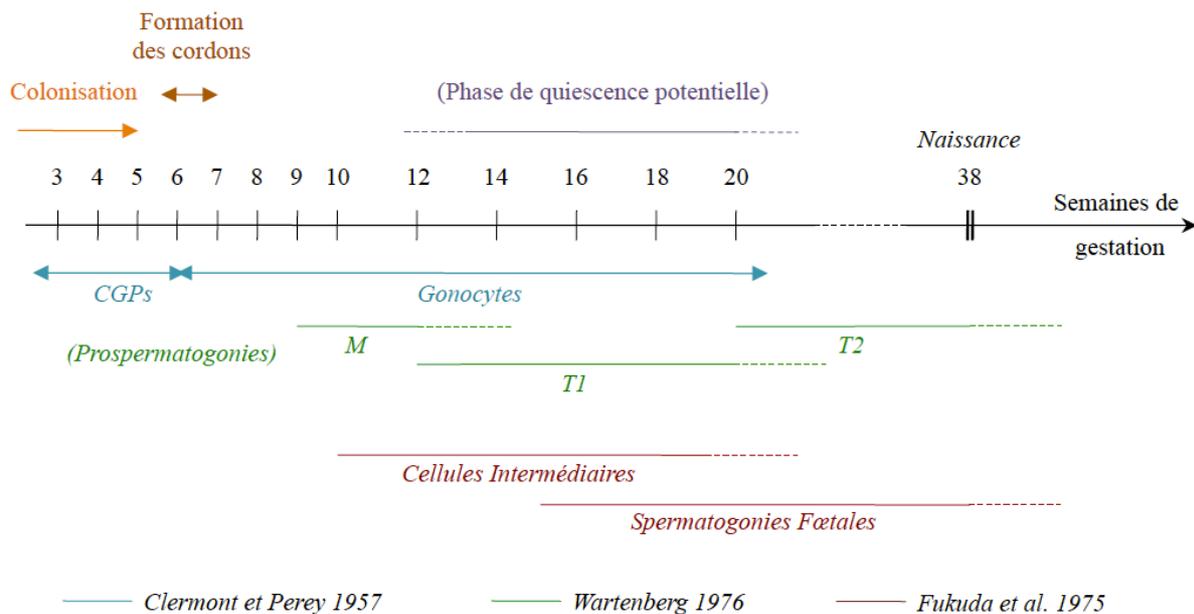
#### III.2.1 Développement des cellules germinales au cours de la vie fœtale:

Les cellules de la lignée germinale subissent deux grandes phases de développement. La première de ces phases a lieu au cours de la vie fœtale et néonatale et permet la transition de la cellule germinale primordiale vers la spermatogonie. La deuxième phase, quant à elle, a lieu au moment de la puberté et représente le cycle de la spermatogénèse qui, à partir de la spermatogonie, produira le pool de spermatozoïdes (Culty, 2009).

Comme mentionné précédemment, les CGPs, premier stade des cellules germinales, sont détectables entre la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine et le tout début de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, par le marquage de la GCAP (Germ Cell Alkaline Phosphatase) également connue sous le nom de PLAP (Placental-Like Alkaline Phosphatase) (Jirasek, 1971; Fujimoto *et al.*, 1977; Cooke *et al.*, 1993). Ces cellules colonisent la crête génitale de la 5<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation.

Tout au long de la vie fœtale (à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation), les cellules germinales subissent une phase de transformation appelée préspermatogénèse. Chez les rongeurs, la nomenclature des cellules germinales fœtales est bien définie, elles sont appelées gonocytes pendant toute cette période. Chez l'Homme, au contraire, la terminologie n'est pas clairement établie. Au début de cette phase de préspermatogénèse, les cellules germinales primordiales sont appelées gonocytes, ce terme fut employé pour la première fois par Clermont et Perey (Clermont and Perey, 1957) afin de décrire les cellules germinales fœtales à partir de leur colonisation de la gonade. Sur le plan histologique, ces cellules sont reconnaissables par leur gros noyau dans lequel plusieurs nucléoles sont bien visibles (Wartenberg, 1976). Deux équipes ont alors proposé leur propre nomenclature (Figure 9). Pour la première, une population de prospermatogonies M (Multiplying) apparaît à partir des

gonocytes fœtaux. Ces cellules qui présentent une activité mitotique émergent à 64 jpc (environ 9 semaines de gestation) puis sont progressivement remplacées par les prospermatogonies T (Transitional) qui réalisent la transition vers les spermatogonies souches. Deux sous catégories de prospermatogonies T sont décrites : les prospermatogonies T1 apparaissent environ à 85 jpc (12<sup>ème</sup> semaine de gestation), puis les prospermatogonies T2 vers la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation (Hilscher and Hilscher, 1976; Wartenberg, 1976) (Figure 9). Parallèlement, Fukuda et collaborateurs ont mis en évidence trois populations de cellules germinales au cours de la vie fœtale qui sont dans l'ordre, les gonocytes puis les cellules intermédiaires et enfin les spermatogonies fœtales. Les cellules intermédiaires sont décrites vers la 10<sup>ème</sup> semaine avec un pic de prédominance aux alentours de la 15<sup>ème</sup> semaine ce qui coïncide avec l'apparition des premières spermatogonies fœtales, lesquelles seront majoritaires à la 22<sup>ème</sup> semaine de vie fœtale. A ce stade là, plus aucun gonocyte n'est observable (Fukuda *et al.*, 1975) (Figure 9). Il est important de noter que, quelque soit la nomenclature, ces différents types de cellules germinales coexistent dans le testicule fœtal.



**Figure 9 : Evolution au cours du développement, des différentes sous populations de cellules germinales fœtales chez l'Homme.**

Cette représentation schématique repose sur les analyses morphologiques qui ont permis d'établir différentes nomenclatures selon les auteurs. D'après Clermont et Perey 1957, Fukuda et al. 1975, Wartenberg 1976. Adapté de Culty 2009.

Ces travaux ont mis en évidence un développement des cellules germinales qui diffère de celui des rongeurs. En effet, chez le rat comme chez la souris, les cellules germinales

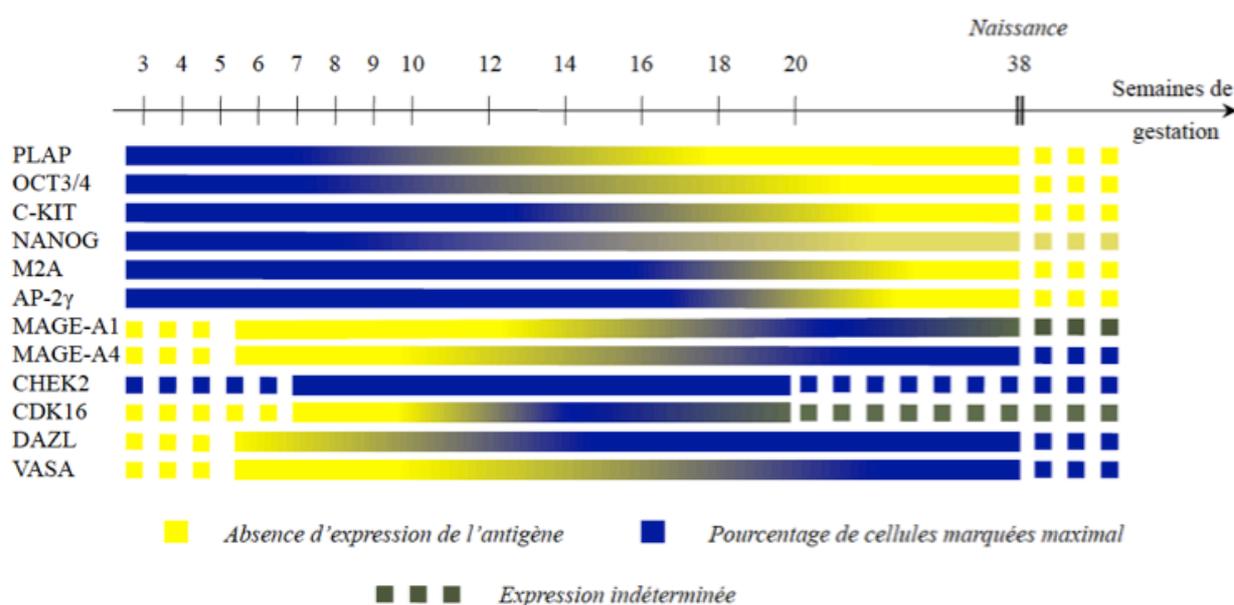
(gonocytes) sont considérées comme une population de cellules synchrones qui présentent une phase initiale de prolifération suivie d'une phase de quiescence, puis leur activité mitotique reprend juste après la naissance (rat) ou en fin de vie fœtale (souris) (Olaso and Habert, 2000). Or chez l'Homme, une telle phase de quiescence n'a, à l'heure actuelle, pas été clairement mise en évidence. Wartenberg décrit les prospermatogonies T1 comme pouvant être les cellules mitotiquement quiescentes, ces données sont corroborées par Gaskell et collaborateurs qui montrent l'absence du marqueur de prolifération PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans les cellules germinales au deuxième trimestre (Gaskell *et al.*, 2004). Néanmoins une autre équipe soutient l'hypothèse inverse puisqu'ils mettent en évidence, dans les mêmes cellules, la présence de Ki-67 dont l'expression est représentative de toutes les phases du cycle cellulaire excepté G<sub>0</sub> (donc les cellules quiescentes) (Pauls *et al.*, 2006). Il est difficile de conclure sur ce point, notamment en raison du fait que les cellules germinales fœtales humaines, contrairement à celles des rongeurs, sont très hétérogènes et que différentes sous populations de cellules germinales coexistent au sein du testicule. Ainsi, ces sous populations pouvant avoir des activités mitotiques différentes, il est particulièrement difficile de démontrer l'existence d'une telle phase de quiescence.

### III.2.2 Les différentes populations de cellules germinales et leurs marqueurs:

Les premières descriptions de la différenciation des cellules germinales fœtales chez l'Homme ont été réalisées par l'analyse des différences morphologiques entre ces cellules par microscopie électronique. L'émergence des études d'antigènes caractérisant un type cellulaire particulier a permis de préciser l'identité moléculaire ainsi que la classification de ces cellules germinales. A la différence des rongeurs dont les cellules germinales expriment au cours de la vie fœtale des marqueurs moléculaires qui recouvrent l'ensemble de la population germinale, les cellules germinales humaines expriment différents antigènes qui permettent de les caractériser en fonction de leur stade de différenciation. Dans le paragraphe suivant, nous nous attacherons à résumer les fenêtres d'expression de ces différents marqueurs au cours du développement testiculaire humain (Revue dans Culty, 2009) (Figure 10 ; Tableau 4).

Gaskell et collaborateurs ont étudié différents marqueurs exprimés par les cellules germinales fœtales humaines au premier et deuxième trimestre de la grossesse (Gaskell *et al.*, 2004). Au premier trimestre, ces cellules correspondent aux gonocytes et expriment fortement

la PLAP et le facteur de transcription OCT3/4 (Octamer-binding Transcription factor 3/4), indicateur du caractère de pluripotence des cellules, ainsi que le récepteur membranaire du Stem Cell Factor (SCF), c-KIT. Au deuxième trimestre, trois populations de cellules germinales sont mises en évidence, correspondant aux gonocytes, aux cellules intermédiaires et aux prospermatogonies décrites dans les années 70. Les premières expriment toujours OCT3/4 ainsi que c-KIT mais voient l'expression de la PLAP diminuer fortement par rapport aux cellules germinales du premier trimestre. Les cellules intermédiaires n'expriment quant à elles plus OCT3/4 ni c-KIT et pas encore MAGE-A4 (melanoma associated antigen A4) qui est un marqueur spécifiquement exprimé par la sous population des prospermatogonies. On peut donc résumer ainsi les trois populations de cellules germinales, les gonocytes présentent un profil OCT3/4(+)/ c-KIT(+)/ MAGE-A4(-), les cellules intermédiaires sont OCT3/4(-)/ c-KIT(-)/ MAGE-A4(-) et assurent la transition avec les prospermatogonies OCT3/4(-)/ c-KIT(-)/ MAGE-A4(+) dans le processus de différenciation des cellules germinales.



**Figure 10 : Expression, chez l'Homme, des principaux antigènes caractéristiques des cellules germinales mâles au cours de la vie fœtale.**

Ces données reposent sur l'analyse immunohistochimique de l'expression de marqueurs spécifiques. D'après Gaskell et al. 2004, Rajpert De-Meyts 2006, Pauls et al. 2005 et 2006, Gjerstorff et al. 2007, Kerr et al. 2008, Høi-Hansen et al. 2005, Anderson et al. 2007.

Ces résultats recourent ceux de Pauls et collaborateurs qui décrivent une population de gonocytes qui expriment OCT3/4 et c-KIT ainsi que la glycoprotéine M2A (marqueur oncogénique décrit dans les cas de Carcinome In Situ (CIS) (Rajpert-De Meyts, 2006), les cellules intermédiaires expriment les mêmes marqueurs moléculaires avec quelques cellules

qui expriment en plus MAGE-A4 alors que les prospermatogonies n'expriment quant à elles plus que MAGE-A4 (Pauls *et al.*, 2006). Ces auteurs décrivent entre la 12<sup>ème</sup> et la 36<sup>ème</sup> semaine de gestation une diminution progressive du nombre de cellules germinales exprimant les marqueurs caractéristiques des gonocytes, inversement à une augmentation du nombre de cellules exprimant MAGE-A4, ce qui met bien en évidence une différenciation progressive et non synchronisée des cellules germinales humaines au cours de la vie fœtale. Un autre membre de la famille des Melanoma Associated Antigens A, MAGE-A1, a été mis en évidence. Son expression apparaît au début du deuxième trimestre de la gestation et connaît un pic vers la 20<sup>ème</sup> semaine avant de décroître (Gjerstorff *et al.*, 2007). L'expression de MAGE-A1 est strictement restreinte aux cellules OCT3/4 négatives, il est donc très probable que MAGE-A1 soit, comme MAGE-A4, un marqueur de la différenciation préspermatogoniale des cellules germinales fœtales.

Différentes études viennent étayer ces résultats et compléter l'identification de ces sous populations par l'ajout de nouveaux marqueurs (Figure 10 ; Tableau 4). Entre autres, NANOG est un facteur de transcription à homéodomaine identifié en 2003 comme marqueur du caractère de pluripotence des cellules souches, puis en tant que marqueur des CGPs et des CIS (Chambers *et al.*, 2003; Rajpert-De Meyts, 2006). Dans le testicule fœtal humain, l'expression protéique de NANOG est détectée dans les cellules germinales primordiales ainsi que dans les gonocytes jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation, période où ces cellules sont mitotiquement actives. L'expression de NANOG est restreinte aux cellules germinales OCT3/4 (+) / c-KIT (+) dont le nombre, élevé entre la 7<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> semaine de gestation, décroît progressivement jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine (Kerr *et al.*, 2008). Cette expression se retrouve ensuite restreinte à une faible population de cellules jusqu'à 3 mois après la naissance (Hoei-Hansen *et al.*, 2005; Rajpert-De Meyts, 2006). Notons que l'expression de NANOG dans le testicule adulte est soumise à controverse, toutefois ce marqueur semble exprimé dans quelques spermatogonies du testicule adulte qui pourraient correspondre au pool de spermatogonies souches (Ezeh *et al.*, 2005).

Le gène *TFAP2C*, décrit à l'origine comme un gène rapidement induit par l'acide rétinoïque, code pour la protéine AP-2 $\gamma$  (Activator Protein 2 gamma), facteur de transcription membre de la famille des protéines possédant un domaine de dimérisation en C-terminal permettant à la fois une fonction de régulation transcriptionnelle activatrice ou inhibitrice en fonction du partenaire de dimérisation (Pellikainen and Kosma, 2007). Chez l'Homme, une étude descriptive de l'expression d'AP-2 $\gamma$  couvrant la période de la 12<sup>ème</sup> à la 36<sup>ème</sup> semaine de gestation a mis en évidence son expression protéique dans les gonocytes du testicule fœtal.

Cette expression est la plus forte entre la 12<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation, puis décroît et n'est finalement plus observable à la 36<sup>ème</sup> semaine de gestation (Pauls *et al.*, 2005). Les variations d'expression d'AP-2 $\gamma$  suivent celles de la protéine c-KIT, ce qui concorde avec les travaux de Yamamoto et collaborateurs qui décrivent *c-KIT* comme un gène cible d'AP-2 $\gamma$  chez l'Homme (Yamamoto *et al.*, 1993). AP-2 $\gamma$  colocalise avec NANOG et OCT3/4 dans les gonocytes fœtaux humains au premier trimestre, ce qui correspond à un stade précoce dans la différenciation des cellules germinales fœtales (Pauls *et al.*, 2005; Pauls *et al.*, 2006).

	CGP	GONOCYTES	CELLULES INTERMÉDIAIRES	SPERMATOGONIES FŒTALES
<i>MARQUEURS DE PLURIPOTENCE</i>	<b>PLAP</b>	PLAP (forte réduction par rapport au CGPs)	Pas d'expression de PLAP	Pas d'expression de PLAP
	<b>OCT3/4</b>	<b>OCT3/4</b>	OCT3/4 (plus faible que dans les gonocytes)	Pas d'expression d'OCT3/4
	<b>c-KIT</b>	<b>c-KIT</b>	c-KIT (plus faible que dans les gonocytes)	Pas d'expression de c-KIT
	<b>NANOG</b>	<b>NANOG</b>	NANOG (restreint à une faible population)	NANOG (restreint à une faible population)
<i>MARQUEURS ONCOGÉNIQUES</i>	<b>M2A</b>	<b>M2A</b>	Pas d'expression de M2A	Pas d'expression de M2A
	<b>AP-2<math>\gamma</math></b>	<b>AP-2<math>\gamma</math></b>	AP-2 $\gamma$	Pas d'expression d'AP-2 $\gamma$
	?	Pas d'expression de MAGE-A1	MAGE-A1	<b>MAGE-A1</b> (diminution en fin de vie fœtale)
	?	Pas d'expression de MAGE-A4	MAGE-A4 (quelques cellules seulement)	<b>MAGE-A4</b>
<i>ACTEURS DU CYCLE CELLULAIRE</i>	?	<b>CHEK2</b>	<b>CHEK2</b>	<b>CHEK2</b>
	?	<b>CDK16</b>	Pas d'expression de CDK16	Pas d'expression de CDK16
<i>MARQUEURS DE LA LIGNEE GERMINALE</i>	?	<b>DAZL</b> (localisation nucléaire)	<b>DAZL</b> (localisation cytoplasmique)	<b>DAZL</b> (localisation cytoplasmique)
	?	Pas d'expression de VASA	VASA	<b>VASA</b>

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principaux antigènes exprimés par les différentes sous populations de cellules germinales au cours de la vie fœtale chez l'Homme.**

Leur rôle présumé ou connu, est indiqué dans la colonne de gauche. D'après Gaskell et al. 2004, Rajpert De-Meyts 2006, Pauls et al. 2005 et 2006, Gjerstorff et al. 2007, Kerr et al. 2008, Hoei-Hansen et al. 2005, Anderson et al. 2007.

Certains antigènes, correspondants à des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, sont également des marqueurs de cellules germinales dans le testicule. En effet, *CHEK2* (Cell Cycle Checkpoint Kinase 2 homolog) code pour une sérine/thréonine kinase impliquée dans le checkpoint entre les phases S et G<sub>2</sub>/M et qui est exprimée très fortement dans le noyau de la majeure partie des cellules germinales entre la 7<sup>ème</sup> et la 19<sup>ème</sup> semaine de gestation. CHEK2 semble ici être exprimée par les différentes sous populations de cellules germinales puisque son expression est mise en évidence dans les gonocytes (OCT3/4 (+) / c-KIT (+) / MAGE-A4(-)), les cellules intermédiaires (OCT3/4(-) / c-KIT(-) / MAGE-A4(-)) ainsi que les prospermatogonies (OCT3/4(-) / c-KIT(-) / MAGE-A4(+)) (Gaskell *et al.*, 2004). *CDK16* (*PCTK1* : PCTAIRE Protein Kinase 1), un autre membre de la famille des sérine/thréonine kinase, présente un pic d'expression entre la 14<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> semaine de gestation, puis la proportion de cellules germinales CDK16 (+) décroît entre la 16<sup>ème</sup> et la 19<sup>ème</sup> semaine de gestation. Le profil d'expression de CDK16 est, par ailleurs, très fortement similaire à celui de c-KIT (Gaskell *et al.*, 2004).

Si tous les marqueurs antigéniques que nous venons de voir sont originellement des marqueurs de pluripotence des cellules souches qui sont également exprimés dans la lignée germinale, différents antigènes ont été identifiés comme véritablement spécifiques de la lignée germinale. C'est notamment le cas de DDX4 (DEAD box polypeptide 4) plus connu sous l'appellation VASA (mvh chez la souris). Cette protéine identifiée à l'origine pour son implication dans le développement des cellules germinales femelles de la drosophile, appartient à la famille des RNA hélicases ATP dépendantes (Castrillon *et al.*, 2000). Chez l'Homme, une étude d'immunolocalisation a mis en évidence l'expression protéique de VASA uniquement à partir du deuxième trimestre entre la 14<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> semaine de gestation dans le cytoplasme des cellules germinales (Anderson *et al.*, 2007). Ces résultats recourent nos observations personnelles. En effet, les expériences de marquages immunofluorescents que nous avons réalisées nous ont permis de mettre en évidence une apparition progressive de l'expression protéique de VASA dans le testicule fœtal humain entre la 6<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation, avec environ 5% de cellules germinales très fortement VASA positives aux alentours de la 12<sup>ème</sup> semaine. De plus, ces cellules VASA positives correspondent aux gonocytes qui deviennent négatifs pour l'expression d'OCT4 au premier et deuxième trimestre (Données personnelles non publiées; Anderson *et al.*, 2007).

DAZL (Deleted in AZoospermia-Like) est le second antigène majeur, spécifique de la lignée germinale. *DAZL* appartient à la famille des gènes « Deleted in AZoospermia » qui contient entre autres *DAZ* et *BOULE*. L'équipe d'Anderson décrit la présence de la protéine

DAZL dans le noyau des gonocytes au premier trimestre de la grossesse (61 à 64 jpc) et dans le cytoplasme des cellules germinales au deuxième trimestre (Anderson *et al.*, 2007). Au premier trimestre, les cellules DAZL positives colocalisent avec les cellules OCT4 positives, en revanche au deuxième trimestre, DAZL est exprimé dans une partie des cellules OCT4 positives ainsi que dans certaines cellules germinales qui ont déjà perdu l'expression d'OCT4.

Regroupés dans leur ensemble, ces travaux démontrent une différenciation progressive des cellules germinales pendant la phase fœtale du développement testiculaire. Les gonocytes, qui expriment majoritairement des marqueurs du caractère de pluripotence des cellules (PLAP ; OCT3/4 ; NANOG ; C-KIT) ainsi que des antigènes oncogéniques (M2A ; AP-2 $\gamma$ ), se différencient d'abord en cellules intermédiaires puis en prospermatogonies. Cette différenciation se caractérise par la perte d'expression progressive des marqueurs gonocytaires et l'acquisition des marqueurs caractéristiques de ces prospermatogonies (MAGE-A1 ; MAGE-A4 ; VASA). Nous avons vu que ces cellules se différencient de manière asynchrone conduisant ainsi à l'existence au sein du testicule fœtal de plusieurs sous populations de cellules germinales à des stades de différenciation variés (Figure 10 ; Tableau 4).

### III.2.3 Facteurs impliqués dans la régulation du nombre des cellules germinales fœtales :

Les cellules germinales fœtales sont un type cellulaire qui prolifère activement afin de constituer le stock de spermatogonies souches nécessaire à la fertilité de l'individu adulte. Au premier trimestre, le testicule fœtal humain contient de 3000 à 10000 cellules germinales entre la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation (Bendsen *et al.*, 2003). Ce nombre croît ensuite progressivement avec environ 100.000 à 600.000 cellules entre la 11<sup>ème</sup> et la 16<sup>ème</sup> semaine de gestation pour atteindre 1 million de cellules germinales aux alentours de la 19<sup>ème</sup> semaine de gestation (Baker *et al.*, 2006; O'Shaughnessy *et al.*, 2007). Au troisième trimestre, Cortes et collaborateurs ont évalué ce nombre à environ 4 millions de cellules (Cortes, 1990). Les autres études portant sur le nombre de cellules germinales dans le testicule fœtal humain sont assez imprécises car elles évaluent le nombre de cellules par tubule séminifère ou par champ de comptage induisant de ce fait un biais dans l'estimation du nombre total, dans la mesure où le testicule fœtal humain est un organe très hétérogène. Par ces méthodes, Helal et

collaborateurs décrivent une augmentation du nombre de cellules germinales pendant toute la période de la grossesse alors que d'autres équipes décrivent une forte augmentation jusqu'à la 22<sup>ème</sup> semaine de gestation puis un ralentissement tendant vers une stagnation jusqu'à la fin de la vie fœtale (Hilscher and Engemann, 1992; Helal *et al.*, 2002; Pauls *et al.*, 2006). Ces données s'antagonisent et bien qu'il soit évident que le nombre de cellules germinales humaines augmente fortement au cours de la vie fœtale, il est toujours impossible de statuer sur une prolifération constante de ces cellules ou sur une potentielle phase de quiescence.

Si l'état mitotique des cellules germinales humaines reste peu décrit pendant le développement du testicule fœtal, on connaît néanmoins certains facteurs qui peuvent influencer le développement de ces cellules, que ce soit en terme de prolifération ou d'apoptose.

L'acide Rétinoïque (RA), dérivé de la vitamine A, est à l'heure actuelle très étudié pour son implication dans l'orientation sexuelle des cellules germinales fœtales au cours du développement. En effet, le RA induit dans la gonade XX l'entrée en méiose des cellules germinales chez la souris ainsi que chez l'Homme (Bowles *et al.*, 2006; Guerquin *et al.*, 2010). Dans le testicule fœtal humain, au premier trimestre de la gestation (de 7 à 12 semaines de gestation), l'addition de RA exogène, dans un modèle de culture organotypique, entraîne une augmentation de l'index de prolifération des cellules germinales tout en augmentant leur apoptose. L'effet apoptotique doit être prédominant puisqu'une diminution du nombre de gonocytes est observée (Lambrot *et al.*, 2006a).

Le Stem Cell Factor (SCF) est un facteur qui semble également impliqué dans la régulation du nombre des cellules germinales fœtales. Ce facteur diffusible est impliqué dans la survie des CGPs au moment de leur colonisation de la gonade bipotentielle chez la souris (Bendel-Stenzel *et al.*, 1998). Chez l'Homme, son récepteur c-KIT est exprimé par les CGPs ainsi que les gonocytes au premier et deuxième trimestre de la gestation. Dans un modèle *in vitro* de culture de gonocytes issus de fœtus âgés de 12 à 22 semaines de gestation, le SCF induit une augmentation de l'index de prolifération de ces cellules (Tu *et al.*, 2007).

Les neurotrophines appartiennent à la catégorie des facteurs de croissance, elles sont impliquées dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la survie neuronale. Cette famille comprend le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) ainsi que les neurotrophines NT3, 4/5 et 6 (Snider, 1994). Chaque neurotrophine dispose de deux types de récepteur, un récepteur spécifique à haute affinité de la famille Trk contenant un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase, et le récepteur

p75<sup>LTNR</sup> de faible affinité, commun à toutes les neurotrophines (Chao, 1994; Snider, 1994). Dans le testicule fœtal humain, l'expression des différentes neurotrophines ainsi que de leurs récepteurs a été décrite au deuxième et troisième trimestre (Robinson *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2006). Le NGF ainsi que NT3 sont essentiellement présents dans les cellules de Sertoli ainsi que dans les cellules interstitielles, probablement les cellules de Leydig. NT4 et p75<sup>LTNR</sup> sont quant à eux majoritairement exprimés dans les cellules périvitubulaires. En ce qui concerne les Trk, ces récepteurs sont exprimés dans la majeure partie des types cellulaires du testicule dont les cellules germinales, avec toutefois un marquage plus prononcé dans les cellules de Leydig. En culture organotypique, l'inhibition des Trk, et donc de la voie des neurotrophines, entraîne une diminution de la prolifération et du nombre des cellules germinales fœtales (Robinson *et al.*, 2003).

Le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) appartient à la famille des facteurs de croissance au même titre que les neurotrophines. Il est composé de deux chaînes A et B qui peuvent former des homodimères ou bien un hétérodimère entre les deux chaînes. Le PDGF agit en se fixant sur son récepteur à activité tyrosine kinase, ce qui induit la dimérisation de ce dernier. Il existe également deux types de récepteur, PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ . Au troisième trimestre de la gestation chez l'Homme, PDGF-A et B sont exprimés dans les cellules de Sertoli ainsi que les cellules de Leydig. De même, les deux formes de PDGFR ont été décrites dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli, et le PDGFR $\beta$  est également exprimé dans les cellules germinales (Basciani *et al.*, 2002). On peut donc aisément imaginer une régulation du développement des cellules germinales fœtales par le PDGF. De plus, Mosselman et collaborateurs ont décrit une surexpression forte de PDGF-A dans les TGCT (Testicular Germ Cell Tumor) provenant de tissus humains (Mosselman *et al.*, 1996). Or, il est fortement suggéré que ces TGCT sont issus d'une anomalie du développement des gonocytes au cours de la vie fœtale ce qui renforce l'idée d'un contrôle de cellules germinales par le PDGF pendant cette période.

Les œstrogènes sont également impliqués dans le contrôle du développement des cellules germinales fœtales humaines. Il existe chez l'Homme deux formes du récepteur aux œstrogènes, les formes ER $\alpha$  et ER $\beta$ , qui existe lui-même sous deux isoformes ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 2. Dans le testicule fœtal humain, l'expression des récepteurs aux œstrogènes a été étudiée au deuxième et troisième trimestre (i.e. entre la 13<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> semaine de gestation) (Brandenberger *et al.*, 1997). ER $\beta$  présente une expression forte entre la 13<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> semaine de gestation puis décroît jusqu'à la 35<sup>ème</sup> semaine de gestation (Boukari *et al.*, 2007). De manière plus précise, une analyse de Gaskell et collaborateurs entre la 13<sup>ème</sup> et la 19<sup>ème</sup>

semaine de gestation montre une expression de ER $\beta$ 1 dans les cellules de Sertoli et les cellules péritubulaires alors que l'expression d'ER $\beta$ 2 semble plutôt restreinte aux cellules germinales (Gaskell *et al.*, 2003). Concernant ER $\alpha$ , sa présence dans le testicule fœtal humain est plus controversée, certaines études ne mettent en évidence ni la protéine, ni l'ARNm alors que d'autres études ont détecté l'un ou l'autre (Brandenberger *et al.*, 1997; Pelletier and El-Alfy, 2000; Takeyama *et al.*, 2001; Gaskell *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2005). Par ailleurs, le 4-Octylph nol, un perturbateur endocrinien qui présente une capacité de liaison aux ERs (White *et al.*, 1994), diminue l'activité mitotique ainsi que le nombre de cellules germinales dans un modèle de culture organotypique de testicules fœtaux humains âgés de 6 à 9 semaines de gestation (Bendsen *et al.*, 2001).

D'autres facteurs ont été décrits pour réguler le nombre de cellules germinales chez les rongeurs, mais leur implication dans la régulation du nombre de cellules germinales fœtales chez l'Homme reste à démontrer.

#### IV. METHODES D'ETUDE DU TESTICULE FŒTAL HUMAIN.

---

L'étude du développement des fonctions testiculaires fœtales et de ses possibles altérations nécessite l'emploi de méthodes d'études particulières en fonction des différentes espèces. Dans le cas des espèces animales et plus particulièrement des rongeurs, l'accessibilité des études *in utero* est un atout indéniable. Néanmoins dans le cas précis du testicule fœtal humain, il est évident que l'emploi de stratégies alternatives est nécessaire.

##### *IV.1. Le modèle de culture organotypique.*

La culture organotypique est une méthode d'étude particulièrement pertinente pour l'étude du développement testiculaire. En effet, nous venons de voir que le testicule fœtal est un organe complexe dont les interactions cellulaires sont fondamentales (Saez, 1994; Habert *et al.*, 2001). La culture organotypique permet le maintien de cette architecture et des relations entre les différents types cellulaires indispensables au développement correct du testicule. Chez l'Homme, la culture organotypique a déjà été utilisée chez l'adulte, notamment pour mettre en évidence la fonction de réservoir du VIH de cet organe (Roulet *et al.*, 2006), mais également sporadiquement au stade fœtal afin d'étudier le développement des cellules

germinales et des cellules péritubulaires ainsi que la fonction des cellules de Leydig (Abramovich *et al.*, 1974; Huhtaniemi *et al.*, 1977; Fowler *et al.*, 2007). Bendsen et collaborateurs se sont également servis du modèle de culture organotypique afin d'étudier l'effet du 4-Octyph nol sur le développement du testicule fœtal humain (Bendsen *et al.*, 2001).

Différentes méthodes de culture de testicule fœtal ont été décrites, notamment en immersion dans du milieu de culture (Hallmark *et al.*, 2007) ou bien placé sur un filtre à l'interface entre le milieu de culture et l'air (Livera *et al.*, 2000). Cette dernière méthode est celle que nous avons privilégiée dans nos travaux. Elle a été développée et caractérisée (en terme de chronologie du développement) dans notre laboratoire depuis de nombreuses années, initialement chez le rat puis appliquée à la souris et l'Homme (Livera *et al.*, 2000; Lambrot *et al.*, 2006a; Lambrot *et al.*, 2006b; Livera *et al.*, 2006). Chaque espèce et chaque stade de développement nécessitent des précautions particulières qui sont maîtrisées. La force de ce système est qu'il permet une oxygénation ainsi qu'une hydratation efficace de l'organe. Ainsi, il permet de reproduire le développement des cellules somatiques et germinales en utilisant un milieu de culture minimum sans aucun facteur de signalisation exogène (sérum, hormones et facteurs de croissance). Cette méthode de culture associée à des stratégies d'analyses histologiques, biochimiques et moléculaires, a notamment permis l'étude des effets des r tino ides sur le testicule fœtal humain (Lambrot *et al.*, 2006a) mais également l'étude de l'impact des rayonnements ionisants (Lambrot *et al.*, 2007) attestant de la pertinence de ce modèle pour démontrer l'influence de facteurs exogènes sur le développement du testicule fœtal humain.

Un des points forts de ce modèle réside dans le fait que, la capacité de cultiver le testicule fœtal dans différents modèles (humain, souris et rat) permet de ce fait, la comparaison inter-espèces des effets d'un composé (Angenard *et al.*, 2010; Angenard *et al.*, 2011). Ceci est particulièrement fondamental lorsqu'il s'agit d'évaluer la pertinence des études réalisées sur un modèle animal par rapport à l'Homme. La longue expertise de notre laboratoire nous a permis de maîtriser également la capacité de cultiver dans les mêmes conditions la gonade fœtale femelle de ces trois espèces. Ceci permet une comparaison entre mâle et femelle et l'évaluation des spécificités sexe-dépendantes de la gonade en terme de développement ainsi qu'en terme de sensibilité (Angenard *et al.*, 2010; Guerquin *et al.*, 2010; Le Bouffant *et al.*, 2010; Angenard *et al.*, 2011).

Si la culture organotypique est un puissant outil permettant notamment une approche expérimentale du développement du testicule fœtal humain, son analyse se révèle toutefois

compliquée en raison du nombre de types cellulaires différents qui composent cet organe. Les analyses biochimiques réalisées sur testicule entier ne permettent en effet qu'une observation globale sans discrimination d'un effet spécifique sur un type cellulaire particulier. Il a donc été nécessaire de développer d'autres stratégies d'analyses.

#### *IV.2. L'isolement de cellules germinales.*

Sachant que la mise en place des cellules germinales au cours de la vie fœtale peut conditionner la fertilité de l'individu à l'âge adulte, il est important de pouvoir analyser spécifiquement les événements moléculaires qui ont lieu au sein des cellules germinales du testicule fœtal ainsi que les effets de perturbateurs potentiels. Ainsi, il est nécessaire de pouvoir isoler ces cellules afin de les étudier individuellement. Plusieurs méthodes ont été développées dans ce but par différents laboratoires et nous avons choisi de nous focaliser sur la méthode de tri par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting).

##### *IV.2.1 MicroDissection Laser (MDL).*

La MDL est une méthode récente qui consiste à découper à l'aide d'un laser la population cellulaire d'intérêt dans une coupe d'organe. Gaskell et collaborateurs ont employé cette méthode afin d'étudier l'expression des récepteurs aux œstrogènes dans le testicule fœtal humain (Gaskell *et al.*, 2003). Plusieurs limites sont à relever concernant cette méthode, notamment au niveau du fixateur utilisé ou de la coloration employée pour identifier les cellules. Une mise au point particulière des conditions d'extraction d'ARN est également indispensable afin d'obtenir un matériel d'une qualité suffisante pour une analyse d'expression de gènes (Sluka *et al.*, 2008). En effet, les ARNs peuvent être fortement dégradés par l'étape de fixation. La MDL ne permet d'obtenir que de très faibles quantités de matériel, et contrairement à d'autres stratégies, les cellules sont fixées, ce qui ne permet pas, par exemple, une remise en culture de ces cellules ou un traitement sur cellules isolées. Toutefois, grâce à cette technique, Sonne et collaborateurs ont pu réaliser le premier transcriptome du gonocyte fœtal humain à partir d'échantillons de 10 à 12 semaines de gestation obtenus par microdissection laser, montrant ainsi une similitude entre le profil transcriptomique des gonocytes et des carcinomes in situ (Sonne *et al.*, 2009).

#### IV.2.2 *Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS).*

Le MACS se base sur le principe d'un marquage immunologique sur cellules vivantes ou fixées de la population de cellules d'intérêt avec un anticorps couplé à des billes métalliques. Les cellules sont ensuite filtrées sur une colonne dont les propriétés magnétiques permettent de retenir les cellules ayant fixées l'anticorps et de récupérer ainsi une population fortement enrichie en cellules d'intérêt. Comparée à la MDL, le MACS permet entre autres de récupérer plus facilement de grande quantité de matériel, et surtout, de récupérer les cellules vivantes ce qui est un atout majeur. Concernant le testicule fœtal humain, une seule étude présente un isolement des cellules germinales de la 7<sup>ème</sup> à 15<sup>ème</sup> semaine de gestation par MACS sur critère de sélection du marqueur membranaire des cellules souches SSEA1 (Stage-Specific Embryonic Antigen 1) (Kerr *et al.*, 2008). Dans cette méthode, la pureté de la population obtenue est directement dépendante de la finesse du marquage immunologique utilisé pour sélectionner les cellules.

#### IV.2.3 *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS).*

Le principe de fonctionnement du tri de cellules par FACS est similaire à celle du MACS, en effet les cellules sont également sélectionnées par marquage immunologique de la population d'intérêt, mais avec un anticorps couplé à un fluorochrome (Alexa 488, PE, etc...). Les cellules sont ensuite passées dans un trieur de cellules qui caractérise et trie les cellules en fonction, non seulement de leur degré de fluorescence, mais également de leur complexité et de leur taille. Cette méthode permet premièrement de discriminer les différentes sous-populations présentes en fonction de l'intensité de fluorescence des cellules, et deuxièmement, il est possible d'obtenir des populations de cellules extrêmement pures car c'est l'expérimentateur qui fixe les seuils des différents critères de sélection. C'est cette méthode que nous avons choisi de mettre au point afin de trier les populations germinales et somatiques du testicule fœtal humain.

Dans l'utilisation de la stratégie de tri par FACS, le choix du marqueur servant de critère de discrimination est crucial et notamment, afin de trier les cellules vivantes. Le choix d'une protéine transmembranaire pouvant être détectée par marquage immunologique sans fixation et perméabilisation de la cellule est indispensable. En ce qui concerne le testicule fœtal, il existe seulement quelques marqueurs extra-cellulaires connus pouvant être utilisés

dans ce but. Parmi ceux-ci, on retrouve le récepteur du SCF (c-KIT) ainsi que SSEA1 (Kerr *et al.*, 2008). Compte tenu de l'hétérogénéité des cellules germinales fœtales humaines que nous avons détaillée précédemment, aucun de ces marqueurs ne recouvre l'intégralité de la population des cellules germinales et leur utilisation induit forcément un biais.

La première étape de notre démarche expérimentale a été d'identifier un antigène le plus représentatif possible des cellules germinales fœtales humaines au cours du premier trimestre de la grossesse. M2A est un antigène onco-fœtal humain correspondant à une sialoglycoprotéine *O*-glycosylée de 40 kDa identifiée comme marqueur des CIS (Bailey *et al.*, 1986; Marks *et al.*, 1999). Des travaux ultérieurs ont ensuite permis d'associer cet antigène à la podoplanine (aussi connue comme gp-36, aggrus ou T1A-2), une glycoprotéine transmembranaire détectée à l'origine dans les podocytes hépatiques chez le rat (Breiteneder-Geleff *et al.*, 1997; Schacht *et al.*, 2005; Sonne *et al.*, 2006). Dans le testicule fœtal humain, M2A est exclusivement localisé à la membrane des gonocytes au premier trimestre de la gestation, en revanche, on peut détecter sa présence dans les cellules de Sertoli immatures au delà de la 14<sup>ème</sup> semaine de gestation (Sonne *et al.*, 2006). Les travaux de Pauls et collaborateurs montrent qu'au premier trimestre, M2A est exprimé par 90 à 95% des cellules germinales ce qui en fait, parmi les différents marqueurs transmembranaires, celui qui recouvre la plus grande fraction de la population germinale. Au cours du deuxième trimestre, le pourcentage de cellules exprimant cet antigène décroît progressivement, cette décroissance est associée à la migration des cellules germinales vers la lame basale des cordons séminifères et à leur différenciation en prospermatogonies (Rajpert-De Meyts *et al.*, 2004; Pauls *et al.*, 2006). Compte tenu de cette spécificité de la localisation de M2A dans les gonocytes du premier trimestre ainsi que du pourcentage de la population germinale couverte, nous avons décidé d'utiliser l'anticorps anti-M2A (D2-40) dans notre démarche d'isolement des cellules germinales.

La mise au point de cette technique de tri par FACS des gonocytes fœtaux humains nous a permis de développer une des toutes premières méthodes de récupération des cellules germinales fœtales humaines vivantes fonctionnant en routine. Elle nous a permis de distinguer les effets d'un traitement par le MEHP (Mono-2-EthylHexyl-Phtalate) sur l'expression de gènes, spécifiquement au sein de la population germinale ainsi que de la population somatique. Cette longue mise au point expérimentale devrait désormais porter ses fruits (Cf Article 3 de cette thèse). Cette méthode nous permet de récupérer aisément des pools de cellules présentant une pureté tout à fait satisfaisante. Afin de pouvoir étudier les mécanismes qui contrôlent le développement des cellules germinales, et notamment

l'influence directe de différents facteurs sur ces cellules, il reste désormais à développer une stratégie de culture de cellules isolées. En effet, les cellules germinales sont des cellules particulièrement fragiles et leur maintien en culture nécessitera la mise au point de conditions expérimentales bien particulières.

## CHAPITRE II. PERTURBATION DU DEVELOPPEMENT TESTICULAIRE FŒTAL

---

### I. LE SYNDROME DE DYSGENESIE TESTICULAIRE.

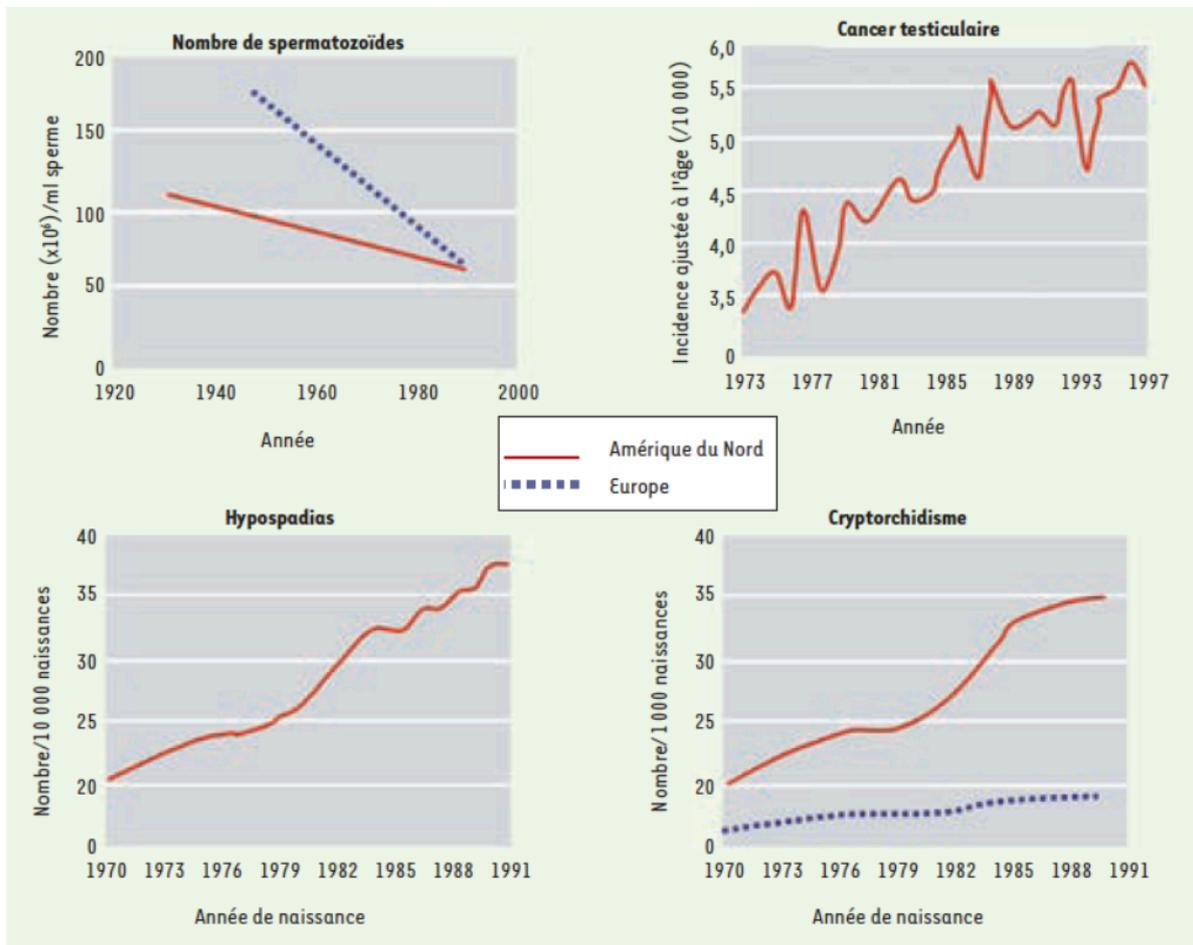
---

Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans notre 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 (revues dans Bay *et al.*, 2006; Sharpe, 2006). De plus, l'incidence du cancer du testicule a augmenté de façon régulière. Une augmentation de l'incidence de deux anomalies congénitales des organes génitaux externes a également été rapportée : la cryptorchidie (Toppari *et al.*, 2001) et l'hypospadias (Paulozzi *et al.*, 1997) (Figure 11).

#### *1.1. Données cliniques.*

Depuis plusieurs années, un grand nombre d'études portant sur différents paramètres de la spermatogénèse (mobilité et morphologie des spermatozoïdes, concentration dans l'éjaculat) ont montré un déclin progressif de la qualité de cette spermatogénèse chez l'Homme. En effet, dans les pays d'Europe du Nord ainsi qu'aux USA, le nombre de spermatozoïdes par éjaculat baisse d'environ 1% par an depuis les années 1940 jusqu'à maintenant (Carlsen *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1995; Irvine *et al.*, 1996; Swan *et al.*, 2000) (Figure 11). L'élévation de la fréquence des cancers testiculaires en Europe a également été mise en évidence. 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) (Figure 11). Parallèlement, de nombreuses études ont montré une augmentation de l'incidence des cas d'hypospadias aussi bien que des cas de cryptorchidie en Europe ainsi qu'aux Etats-Unis (Skakkebaek *et al.*,

2001; Bay *et al.*, 2006) (Figure 11). Ces anomalies sont actuellement les deux anomalies congénitales les plus répandues dans les pays industrialisés, avec une incidence de la cryptorchidie d'environ 3% des naissances chez les individus mâles (Barthold and Gonzalez, 2003).



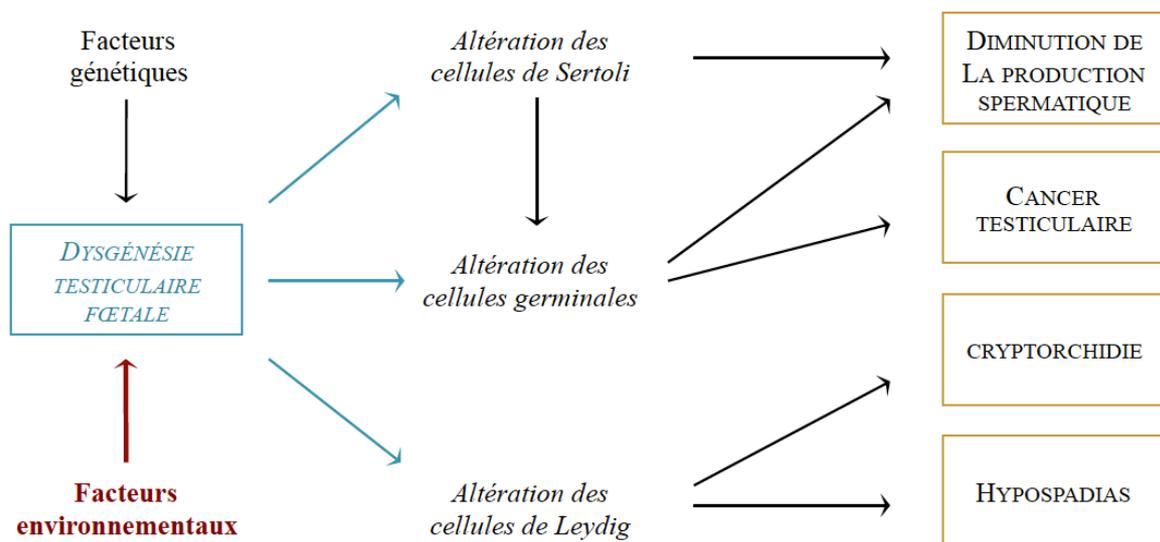
**Figure 11 : Evolution des différentes anomalies de la fonction de reproduction mâle humaine, au cours des dernières décennies.**

La production spermatique diminue progressivement, alors qu'en parallèle, le cancer testiculaire, l'hypospadias et la cryptorchidie voient leur incidence augmenter. D'après Topari *et al.* 2001; Sharpe et Irvine 2004.

Il est intéressant de soulever l'interrelation existante entre ces différentes anomalies. Certaines d'entre elles sont en effet un facteur de risque pour l'apparition des autres anomalies. Différentes études ont montré que ces quatre anomalies voyaient leur incidence respective maximale au Danemark et minimale en Finlande, étayant ainsi la notion d'interrelation entre ces anomalies. Par ailleurs, la cryptorchidie est un facteur de risque pour l'apparition du cancer testiculaire, un patient atteint de cryptorchidie bilatérale présente 10%

de risque de développer un cancer testiculaire contre 1% chez un patient non atteint (Wood and Elder, 2009). Inversement, le traitement de la cryptorchidie avant la puberté diminue les risques de cancer chez l'adulte (Akre *et al.*, 2009; Akre and Richiardi, 2009). La cryptorchidie est également un facteur de risque pour la diminution de la qualité spermatique et l'hypospadias, de même que l'oligospermie est un facteur de risque pour le cancer testiculaire (Sharpe, 2003).

L'intégration de l'ensemble de ces données a permis à Sharpe et Skakkebaek de poser l'hypothèse selon laquelle ces différentes altérations de la fonction de reproduction masculine seraient les manifestations symptomatiques d'un même syndrome baptisé TDS pour « Testicular Dysgenesis Syndrome » qui prendrait son origine dans une perturbation du développement testiculaire durant la vie fœtale (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Sharpe, 2001) (Figure 12).



**Figure 12 : Hypothèse de l'origine du syndrome de dysgénésie Testiculaire (TDS).**

L'altération du développement des différents types cellulaires du testicule, au cours de la vie fœtale, peut expliquer l'apparition des anomalies observées à la naissance ainsi qu'à l'âge adulte. D'après Sharpe et Skakkebaek 1993; Bay et al. 2006.

### 1.2. Origine fœtale du TDS.

Cette origine fœtale du TDS s'appuie sur différents arguments et notamment sur le fait que les deux grandes fonctions du testicule, la gamétogenèse et la stéroïdogénèse, prennent place au cours de la vie fœtale. L'altération de la mise en place de ces deux fonctions

fondamentales peut expliquer l'apparition à la naissance et chez l'individu adulte des symptômes du TDS (revue dans Wohlfahrt-Veje *et al.*, 2009) (Figure 12).

### 1.2.1 Hypospadias et cryptorchidie.

L'hypospadias et la cryptorchidie sont deux anomalies du développement de l'appareil génital, toutes deux sous l'influence de la production de testostérone.

En effet, le développement des organes génitaux internes et externes se fait à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme sous contrôle de la testostérone (Baskin, 2000). Une altération de la production d'androgènes au cours du développement testiculaire peut aisément se traduire par une anomalie du développement des organes génitaux externes et expliquer l'origine des cas d'hypospadias observables à la naissance. De même, la descente testiculaire chez l'Homme s'articule autour de deux phases pendant la vie fœtale : une première phase de descente trans-abdominale contrôlée par l'INSL-3 pendant le premier trimestre de la grossesse, suivie d'une seconde phase inguino-scrotale sous l'influence de la testostérone (revue dans Ivell and Hartung, 2003). De ce fait, l'altération de la production des androgènes fœtaux explique également l'apparition des cas de cryptorchidie à la naissance. Ceci a largement été confirmé expérimentalement chez les rongeurs, où la diminution de la production de testostérone entraîne à la fois hypospadias et cryptorchidie (Skakkebaek *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Réduction de la production spermatique.

Il a effectivement été démontré qu'une réduction expérimentale du nombre de cellules germinales fœtales chez la souris ainsi qu'une réduction du nombre de cellules de Sertoli périnatales chez le rat, se traduisent par une diminution de la production spermatique chez l'adulte (Orth *et al.*, 1988; Forand *et al.*, 2009). D'autres travaux expérimentaux viennent compléter ces données, notamment grâce à l'étude de modèles de souris transgéniques. Les souris *gcd* (germ cell deficiency) et *Pog*<sup>-/-</sup> sont deux lignées de souris transgéniques qui présentent une anomalie de la prolifération des CGPs se traduisant par une réduction du nombre de gonocytes pendant la vie fœtale. Dans ces deux lignées, cette diminution du nombre de gonocytes fœtaux se répercute sur la spermatogenèse adulte par une diminution du

nombre de spermatozoïdes ainsi qu'une stérilité chez les souris *gcd* qui présentent une réduction fœtale plus drastique que les souris *Pog<sup>-/-</sup>* (Lu and Bishop, 2003).

### 1.2.3 Cancer testiculaire.

Le cancer du testicule est une forme de cancer assez rare puisqu'il 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 18 et 30 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.

Plusieurs types de tumeurs peuvent caractériser le cancer du testicule, toutefois, plus de 90 % d'entre elles sont issues des cellules germinales du testicule (Intra Testicular Germ Cell Tumors) et peuvent être classées en deux catégories, les tumeurs séminomateuses et non-séminomateuses. Ces deux catégories de tumeurs germinales dérivent cependant d'un même précurseur, le Carcinome *In Situ* (CIS) ou Intra-Tubular Germ Cell Neoplasia Unclassified (ITGCNU) (Skakkebaek, 1972). L'hypothèse établie par Skakkebaek, et selon laquelle les CIS résulteraient d'une anomalie de la différenciation des cellules germinales fœtales (plus particulièrement des gonocytes ou des CGPs), est soutenue par deux arguments majeurs (Skakkebaek *et al.*, 1987; Rajpert-De Meyts *et al.*, 1998; Rajpert-De Meyts, 2006; Rajpert-de Meyts and Høe-Hansen, 2007). Premièrement, des cas de CIS ont été détectés dans les testicules de nouveaux-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). Deuxièmement, de plus en plus d'études montrent une similitude entre les cellules qui composent les CIS et les gonocytes fœtaux (Dieckmann and Skakkebaek, 1999; Rajpert-De Meyts, 2006). En effet, les cellules des CIS présentent tout d'abord un aspect morphologique proche de celui des gonocytes (Albrechtsen *et al.*, 1982; Skakkebaek *et al.*, 1987). Au-delà de cette similitude morphologique, les cellules composant les CIS expriment, d'un point de vue immunohistologique, des marqueurs moléculaires caractéristiques des CGPs et gonocytes, alors qu'ils sont absents des cellules germinales de l'individu adulte. Le premier marqueur identifié, exprimé à la fois par les cellules germinales fœtales ainsi que dans les carcinomes *in situ* est c-KIT, récepteur membranaire du SCF (Rajpert-De Meyts and Skakkebaek, 1994; Jorgensen *et al.*, 1995). Depuis, d'autres études ont mis en évidence un grand nombre de

marqueurs co-exprimés à la fois par les gonocytes et les cellules du CIS, c'est notamment le cas d'OCT3/4 et de NANOG, caractéristiques du potentiel souche de la cellule. Plus récemment, la protéine AP-2 $\gamma$ , mise en évidence dans les CIS, a également été décrite dans les CGPs ainsi que dans les gonocytes du testicule fœtal humain. Cette protéine est, au même titre que NANOG et OCT3/4, associée au caractère indifférencié des cellules (revue dans Rajpert-De Meyts, 2006). Une étude par Sonne et collaborateurs vient étayer ces résultats. Les auteurs ont réalisé une comparaison entre le profil d'expression transcriptionnel des gonocytes et celui des cellules du CIS et montrent que ces deux profils sont extrêmement semblables. En effet, seul cinq gènes voient leur profil d'expression modulé entre les gonocytes et les CIS (Sonne *et al.*, 2009). Enfin, récemment, Almstrup et collaborateurs se sont intéressés au profil épigénétique de ces deux populations cellulaires et montrent que les CIS, tout comme les gonocytes, présentent un très faible taux de modifications épigénétiques associées à la répression transcriptionnelle. Ce profil épigénétique similaire des CIS et des gonocytes est en revanche véritablement différent de celui des cellules germinales de l'adulte (Almstrup *et al.*, 2010).

### 1.3. Étiologie du syndrome de dysgénésie testiculaire.

#### 1.3.1 Origine génétique.

La ou les causes exactes de l'émergence du TDS et de ses symptômes sont à l'heure actuelle mal établies. Une origine génétique de ces anomalies est pleinement envisageable, notamment en ce qui concerne l'étiologie du cancer testiculaire (Rajpert-De Meyts, 2006) (Figure 12). En effet, l'amplification de certaines zones chromosomiques et plus particulièrement la région du bras court du chromosome 12, qui contient les gènes *NANOG*, *STELLAR* (*DPPA3*: Developmental Pluripotency Associated 3) et *GDF3* (Growth Differentiation Factor 3), a été fréquemment mise en évidence dans les cas de cancer testiculaire (Atkin and Baker, 1982; Castedo *et al.*, 1988; Rodriguez *et al.*, 1992). Parallèlement, le polymorphisme de certains gènes impliqués dans le développement de la fonction de reproduction a également été évoqué. Plusieurs études ont rapporté une corrélation inverse entre le nombre de répétition CAG de la séquence codante du récepteur des androgènes et une diminution de la production ou de la qualité du sperme (Mifsud *et al.*, 2001; von Eckardstein *et al.*, 2001; Harkonen *et al.*, 2003; Milatiner *et al.*, 2004). De même, certaines mutations ou certains polymorphismes de l'*INSL3* et de son récepteur (*LGR8*) qui

contrôlent une des deux phases de la descente testiculaire sont associés au cas de cryptorchidie chez l'Homme (Ferlin *et al.*, 2003).

La prédisposition génétique est une des causes de l'origine des symptômes du TDS. Toutefois, il semble que le facteur environnemental, et plus précisément l'impact des polluants environnementaux de plus en plus présents, soit également une cause importante de l'apparition du TDS. De même, la possibilité de l'influence environnementale sur un terrain génétiquement favorable n'est pas à exclure.

### 1.3.2 Hypothèse de l'influence de facteurs environnementaux.

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).

Les observations faites lors d'analyse de la faune sauvage sont les premières données qui ont étayé l'hypothèse d'un impact délétère des perturbateurs endocriniens de l'environnement sur la fonction de reproduction masculine. Un des exemples le plus parlant concerne la contamination au DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) du lac Apopka en Floride, dans lequel les alligators mâles ont développé un certain nombre d'altérations. Ces animaux ont présenté un taux de testostérone diminué, associé à des cas de micropénis, et ont développé des problèmes d'organisation testiculaire, 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 (Facemire *et al.*, 1995; Matthiessen and Sumpter, 1998; Vos *et al.*, 2000).

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 (revue dans Damstra, 2002). Par exemple, 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 ; soit sur leur lieu de travail soit sur leur lieu d'habitation (Weidner *et al.*, 1998). D'autres études épidémiologiques ont également montré des corrélations entre les taux de phtalates, un composé toxique issu de la fabrication de matières plastiques, et la modification de différents indicateurs de la masculinisation du nouveau-né (Swan *et al.*, 2005; Main *et al.*, 2006).

L'influence de composés issus de l'industrie pharmaceutique, et notamment des molécules de synthèse à activité xeno-œstrogénique ou antiandrogénique, 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.*, 2005; Palmer *et al.*, 2009). 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 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 spécifiquement aux phtalates. Ces polluants environnementaux sont produits en très grande quantité notamment dans l'industrie plastique et se retrouvent de ce fait dans un très grand nombre d'éléments de notre environnement. Par ailleurs, un grand nombre d'arguments expérimentaux viennent étayer l'hypothèse d'une perturbation du développement testiculaire après exposition aux phtalates. En effet, les différents travaux réalisés chez le rat suggèrent, pour ces composés, un rôle de perturbateurs endocriniens

## II. LES PHTALATES

---

Les phtalates sont une famille de composés chimiques à chaînes carbonées, dérivés par diestérification de l'acide phtalique ( $C_6H_4(COOH)_2$ ) (Figure 13). Il existe un grand nombre de phtalates différents, identifiables selon la longueur de leurs chaînes carbonées. Les phtalates sont apparus dans les années 1920 en remplacement du camphre qui était alors le plastifiant utilisé dans la synthèse du nitrate de cellulose. Dès 1931, les phtalates sont utilisés dans le procédé de plastification des PVCs (PolyVinyl Chlorure) comme fluidifiants de ces composés (30% w/w). On les retrouve donc à l'heure actuelle dans un grand nombre de composés contenant des PVCs (ce qui représente 90% de l'utilisation des phtalates). Les phtalates rentrent également en compte dans la fabrication de jouets, adhésifs et colles, peintures industrielles, revêtements de surface, encres d'imprimante, insecticides, emballages plastiques, détergents et solvants, mais également dans différents produits cosmétiques tels que parfums, déodorants, vernis à ongles, laques pour cheveux. Certains appareillages médicaux, emballages de médicament et poches de transfusion sanguine contiennent également des doses élevées de phtalates (Hauser *et al.*, 2004; Koo and Lee, 2004; Heudorf *et al.*, 2007). Le Di-2-EthylHexyl-Phtalate (DEHP ;  $C_6H_4(CO_2C_8H_{17})_2$ ) est actuellement le phtalate le plus répandu avec une production mondiale estimée à 3 millions de tonnes/an.



**Figure 13 : Formule semi développée de la structure générale des phtalates.**

Les phtalates sont issus d'une double estérification de l'acide phtalique. La longueur de la chaîne carbonée provenant des alcools détermine le type de phtalate.

Depuis les années 70, les phtalates sont incriminés en tant que produits toxiques. Bien que certains soient considérés comme inoffensifs tels que le DEP (DiEthylPhtalate), le DMP (DiMEthylPhtalate) et le DOTP (DiOctyl Tere-Phtalate) d'autres sont clairement reconnus depuis plusieurs années comme des substances toxiques (Liu *et al.*, 2005). En effet, depuis

En mars 2001, le DEHP et le DBP (Di-n-ButylPhtalate) sont officiellement classés auprès de la Commission Européenne comme substances toxiques de catégorie 2 « Substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'Homme » pour la fonction de reproduction sous la labellisation R61 « Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant » ([http://ec.europa.eu/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/index_en.htm)). Le BBP (ButylBenzylPhtalate) a rejoint cette catégorie en juin 2004.

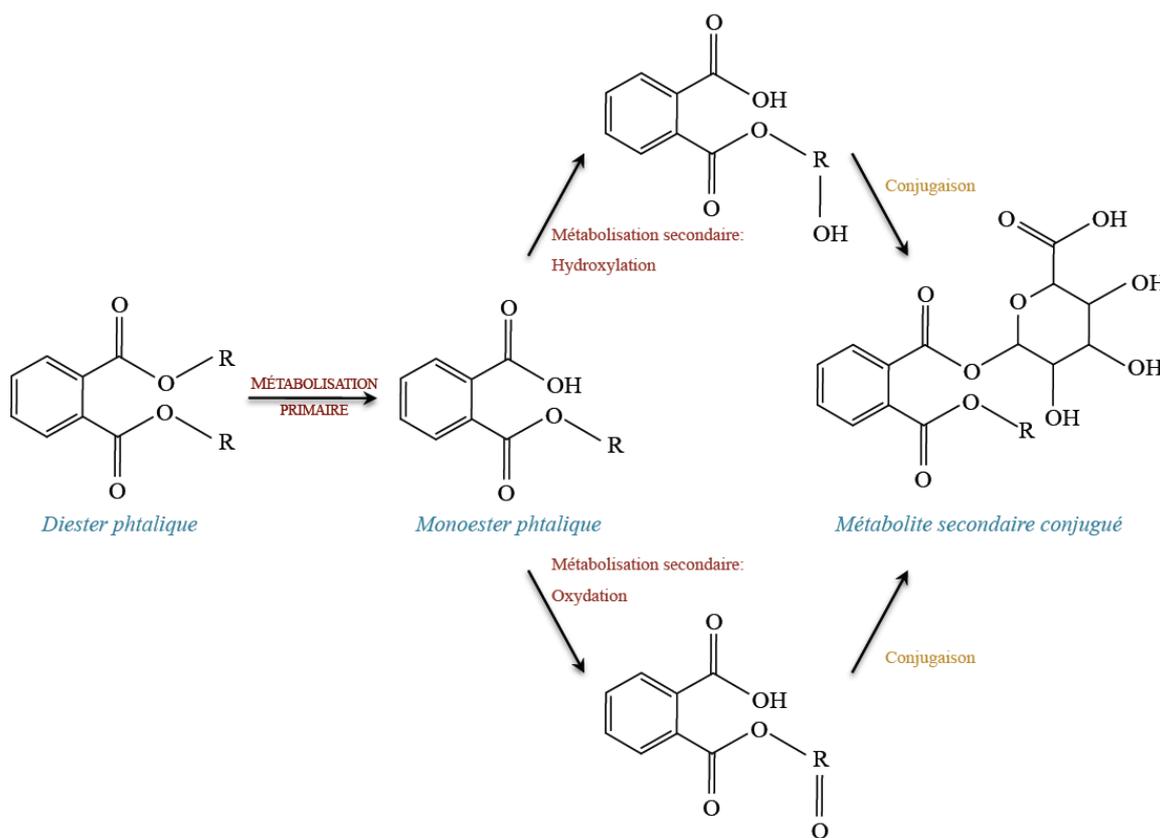
La quantité de phtalates produite dans le monde ainsi que la potentielle toxicité de certaines de ces molécules en font un sujet d'étude privilégié depuis de nombreuses années. On possède en effet, un certain nombre de données épidémiologiques et expérimentales sur l'impact toxique de ces molécules au cours du développement, dans des modèles *in vivo* et *in vitro*. Ces études ont été majoritairement réalisées chez les rongeurs, modèles animaux privilégiés, mais également chez les primates non humains. Seules quelques rares études ont été réalisées chez l'Homme.

### II.1. Généralités.

Les phtalates sont des composés non liés covalentement au plastique et qui peuvent, de ce fait, diffuser librement ce qui entraîne l'existence de multiples sources d'exposition. Il existe différentes voies d'absorption des phtalates par l'organisme. L'ingestion d'éléments nutritifs contenant des phtalates ayant librement diffusé depuis leurs emballages constitue la plus représentative des voies d'expositions. En effet, plusieurs études ont montré la présence dans différents produits alimentaires ainsi que dans l'eau de bouteille, de phtalates ayant migré depuis leurs contenants. Cette migration peut avoir lieu notamment au moment du conditionnement et du stockage de ces denrées alimentaires (Page and Lacroix, 1995; Petersen and Breindahl, 2000; Heudorf *et al.*, 2007). L'inhalation de particules contaminées contenant des phtalates constitue le deuxième mode d'exposition notable. Différentes études ont démontré la présence de phtalates dans l'air ainsi que dans les poussières domestiques provenant majoritairement des matériaux de construction et des éléments synthétiques tels que les revêtements de sol ou les peintures (Clausen *et al.*, 2004; Fromme *et al.*, 2004; Bornehag *et al.*, 2005). Une contamination transdermique est également possible dans le cas des cosmétiques contenant des phtalates, toutefois cette forme d'exposition est largement minoritaire. Il est à noter qu'un taux élevé de phtalate ayant été dosé dans les poches de sang médicales (Wormuth *et al.*, 2006), la transfusion sanguine peut dès lors, constituer une forte source ponctuelle de contamination.

### II.1.1 Métabolisme des phtalates.

Dans l'organisme, les diesters d'acide phtalique sont rapidement métabolisés au cours d'une succession de réactions enzymatiques. On distingue deux réactions majeures. Lors de la réaction de phase I, le diester de phtalate ( $C_6H_4(COOR)_2$ ) est hydrolysé au niveau d'une des chaînes carbonées de sa structure en monoester ( $C_6H_4(COOR)COOH$ ), produisant de ce fait son monoester primaire correspondant (Figure 14). Ces métabolites primaires sont considérés comme les composés biologiquement actifs des diesters respectifs (Heindel and Powell, 1992). Cette première phase de métabolisation a lieu majoritairement au niveau de l'intestin et de différents organes parenchymateux et est catalysée par des lipases et estérases (Calafat and McKee, 2006; Rusyn *et al.*, 2006; Frederiksen *et al.*, 2007).



**Figure 14 : Représentation schématique générale des métabolisations primaire et secondaire des diester phtaliques à chaînes carbonées longues.**

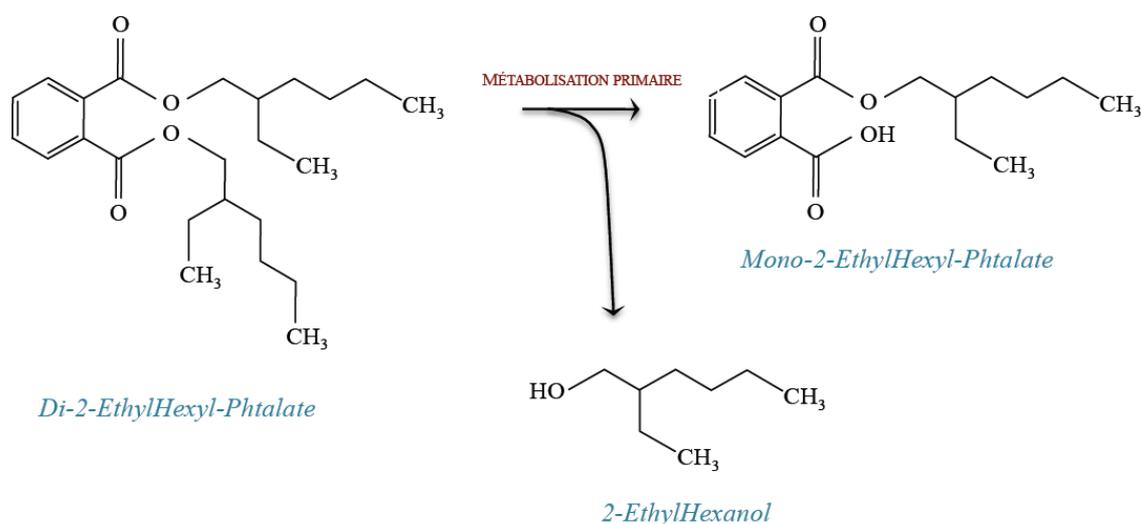
La conjugaison des métabolites secondaires permet leur excrétion par l'organisme. D'après Frederiksen et al. 2007.

Si les phtalates à courtes chaînes carbonées tel que le DEP ou le DMP ne sont l'objet que d'une métabolisation primaire, les diesters à longues chaînes comme le DEHP et le DBP subissent une série de métabolisations secondaires (principalement composées

d'hydroxylation et d'oxydation) sur leur chaîne aliphatique carbonée, produisant une grande variété de monoesters secondaires (Figure 14). Ces métabolites secondaires sont facilement « conjuguables » (Albro *et al.*, 1982; Astill, 1989) sous l'action de l'uridine 5'-diphosphoglucoronyle transférase, qui fixe un élément glucoronide au niveau du groupement alcool du monoester de phtalate. La conjugaison augmente le pouvoir hydrosoluble du métabolite ce qui facilite son excrétion dans les urines (Silva *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005).

Dans le cas du DEHP, classé parmi les phtalates à chaînes carbonées longues, la métabolisation primaire est catalysée par des lipases non spécifiques (monooxygénases mixtes cytochrome p450 dépendantes) localisées au niveau de l'intestin et du pancréas (Albro *et al.*, 1982). Cette métabolisation conduit à la formation de deux métabolites primaires, le Mono-2-EthylHexyl-Phtalate (MEHP) considéré comme le métabolite actif du DEHP, et le 2-EthylHexanol (sous produit de la métabolisation) (Gray and Beamand, 1984; Barber *et al.*, 1994) (Figure 15). Le MEHP peut ensuite subir une série de transformations biochimiques composées d'hydroxylation et  $\omega$ -oxydations de la chaîne aliphatique carbonée restante amenant la synthèse des différents métabolites secondaires du DEHP (Koch *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2006). Il existe environ une quinzaine de métabolites secondaires du DEHP dont les principaux sont le Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) Phthalate (5OH MEHP), le Mono (2-ethyl-5-oxo-hexyl) Phthalate (5oxo MEHP), le Mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) Phthalate (5cx MEPP) et le Mono (2-(carboxymethyl) hexyl) Phthalate (2cx MMHP). La distribution des différents métabolites est très variable selon les espèces (rat ou souris) et en fonction de l'âge de l'animal (Albro, 1986; Heindel and Powell, 1992).

Les différentes étapes de métabolisation des phtalates ainsi que la potentialité des métabolites à être conjugués rendent leur vitesse d'élimination difficile à évaluer. Koch et collaborateurs, en réalisant une expérience d'ingestion de DEHP marqué au deutérium par voie orale sur un volontaire (Koch *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005), ont permis de mieux caractériser le profil d'élimination de ce composé. Les auteurs ont démontré, qu'indépendamment de la dose ingérée, 65 à 70% de la quantité totale de DEHP est éliminée dans les 24h qui suivent l'ingestion. Cette élimination se fait en très grande majorité sous forme de métabolites II (5oxo-MEHP, 5OH-MEHP, 5cx-MEPP et 2cx MMHP) puisque seulement 7,3% de la dose éliminée l'a été sous forme de MEHP. Ce fait est très certainement dû au caractère moins hydrophile du MEHP qui reste accumulé dans le sang. En effet, les auteurs de ces travaux ont montré que le MEHP, après l'ingestion, était de loin le métabolite le plus présent dans le plasma sanguin (revue in Wittassek *et al.*, 2007).



**Figure 15 : Représentation schématique de la métabolisation primaire du Di-2-EthylHexyl-Phtalate.**

La métabolisation primaire du DEHP produit le Mono-2-EthylHexyl-Phtalate, ainsi qu'un alcool, le 2-EthylHexanol.

D'une manière générale, on constate peu de rétention des phtalates dans l'organisme, chez le rat l'absorption de  $^{14}\text{C}$ -DEHP montre une très légère accumulation dans les tissus adipeux, mais 80% de la dose absorbée est éliminée dans les urines et excréments dans les 7 jours suivant l'ingestion (Tanaka *et al.*, 1975). Il a également été démontré que la persistance du DEHP après l'absorption d'une dose unique (25mmol/kg) chez le rat, était la plus longue dans le foie et le testicule, organes cibles majeurs (Oishi and Hiraga, 1982). Dans le cas du testicule, cet organe présente la particularité d'avoir, 6h après l'ingestion, le ratio MEHP/DEHP le plus élevé. Toutefois, peu d'études décrivent la répartition des phtalates et de leurs métabolites dans les différents tissus que ce soit chez l'Homme ou dans d'autres modèles animaux. En revanche, une étude de gavage de rattes gestantes avec du DEHP marqué au  $^{14}\text{C}$  a permis de mettre en évidence le passage de ce composé à travers la barrière foëto-placentaire (Stroheker *et al.*, 2006), ce qui est consistant avec l'ensemble des études de gavage de rattes gestantes montrant un effet toxique sur le foetus.

## II.1.2 Concentrations de phtalates

### II.1.2.1. Méthodes de mesure.

Aux vues de la multitude et de la diversité des sources d'exposition aux phtalates et afin d'évaluer les risques potentiels pour l'individu, il est important de pouvoir estimer le taux d'exposition auquel la population peut être soumise dans son environnement quotidien. Il existe fondamentalement deux méthodes permettant une estimation de l'exposition aux phtalates.

La première méthode consiste à mesurer les quantités des différents phtalates dans les éléments de l'environnement, potentiellement susceptibles de diffuser ces composés selon les voies d'absorption décrites ci-dessus (i.e. inhalation, ingestion, etc.) (Wormuth *et al.*, 2006; Heudorf *et al.*, 2007). Cette méthode est biaisée par la multiplicité des sources de phtalates qui rendent extrêmement difficile une quantification précise des risques d'exposition.

La deuxième stratégie d'évaluation des taux d'exposition consiste donc à mesurer dans les fluides biologiques (principalement les urines) le niveau des différents phtalates ainsi que leurs métabolites respectifs et d'approximer ainsi la quantité de phtalate absorbée. Cette méthode présente l'avantage de s'affranchir des différentes sources d'exposition possibles puisque la mesure représente véritablement l'ensemble des expositions cumulées. Cette stratégie permet en outre d'estimer la quantité de phtalates métabolisés et de déterminer les proportions de métabolites en fonction de leur activité biologique (et donc de leurs potentiels effets toxiques). Cette méthode est donc plus performante et plus pertinente que la mesure des niveaux de phtalates dans l'environnement.

### II.1.2.2. Niveaux de phtalates dans les fluides biologiques.

Dans la population, chaque individu est exposé à un panel de phtalates différents, avec un taux variable en fonction de l'âge, de l'origine raciale, mais également du sexe (Koch *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004a). En effet, les femmes présentent, d'une manière générale, un taux de phtalates dans les urines plus élevé que les hommes. Ces données signifient que le fœtus chez une femme enceinte, est potentiellement soumis à des taux relativement élevés de phtalates.

Afin d'évaluer l'exposition potentielle des femmes enceintes, les taux de phtalates de différents fluides biologiques peuvent être pris en compte, notamment l'urine, le lait maternel

ou encore le sérum, le liquide amniotique et le sang du cordon ombilical. Plusieurs études épidémiologiques ont mesuré les concentrations de monoesters de certains phtalates parmi les plus répandus dans l'environnement, nous compilerons ici uniquement les données concernant le MEHP (Silva *et al.*, 2004a; Silva *et al.*, 2004b; Swan *et al.*, 2005; Main *et al.*, 2006; Hogberg *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009) (Tableau 5).

	CONCENTRATION MINIMALE	CONCENTRATION MAXIMALE	REFERENCES
<i>URINE CHEZ LA FEMME ENCEINTE</i>	5.10 <sup>-9</sup> M	8.10 <sup>-8</sup> M	- Silva <i>et al.</i> 2004
	5.10 <sup>-9</sup> M	3.10 <sup>-8</sup> M	- Swan <i>et al.</i> 2005
	2.10 <sup>-8</sup> M	5.10 <sup>-7</sup> M	- Huang <i>et al.</i> 2009
<i>LIQUIDE AMNIOTIQUE</i>	< 3.10 <sup>-9</sup> M	1.10 <sup>-8</sup> M	- Silva <i>et al.</i> 2004
	< 3.10 <sup>-9</sup> M	4.10 <sup>-7</sup> M	- Huang <i>et al.</i> 2009
<i>SANG DU CORDON OMBILICAL</i>	indétectable	10 <sup>-5</sup> M	- Latini <i>et al.</i> 2003
<i>LAIT MATERNEL</i>	5.10 <sup>-9</sup> M	5.10 <sup>-6</sup> M	- Main <i>et al.</i> 2006
	2.10 <sup>-9</sup> M	2.10 <sup>-8</sup> M	- Högberg <i>et al.</i> 2008
<i>SERUM CHEZ LA FEMME ENCEINTE</i>	2.10 <sup>-9</sup> M	2.10 <sup>-8</sup> M	- Högberg <i>et al.</i> 2008
<i>URINE CHEZ LA FEMME ENCEINTE</i>	10 <sup>-8</sup> M	2.10 <sup>-7</sup> M	- Högberg <i>et al.</i> 2008

**Tableau 5 : Récapitulatif des taux de MEHP mesurés dans les différents fluides biologiques de la femme.**

Ce tableau compile les taux de MEHP maximum et minimum. On constate qu'il existe une grande variabilité de ces taux d'une femme à l'autre et d'un fluide biologique à l'autre.

Il est à noter en premier lieu l'existence d'une très forte variabilité entre les individus d'une même cohorte quant aux concentrations de MEHP qui peuvent être mesurées dans les différents fluides biologiques. En effet, certaines patientes présentent des taux très bas de l'ordre de 10<sup>-9</sup>M voire non détectables, alors qu'à l'inverse, des concentrations allant jusqu'à 5.10<sup>-7</sup>M dans les urines et 5.10<sup>-6</sup>M dans le lait maternel ont pu être mesurées. Högberg et collaborateurs concluent de leurs études que la mesure des taux de phtalates dans les urines est l'indicateur le plus fiable dans l'évaluation des risques d'exposition des femmes enceintes à ces composés (Hogberg *et al.*, 2008). Toutefois, les mesures réalisées dans ces liquides ne sont pas nécessairement représentatives de l'exposition du fœtus, même si il est maintenant établi que les phtalates traversent la barrière foeto-placentaire (Stroheker *et al.*, 2006). Afin d'apprécier l'exposition propre du fœtus, des mesures de taux de MEHP ont été réalisées dans

des fluides biologiques d'origine fœtale. Ici aussi, on peut observer une grande variabilité entre les échantillons, allant de taux indétectables jusqu'à des doses de  $4 \cdot 10^{-7} \text{M}$  dans le liquide amniotique (Silva *et al.*, 2004a; Huang *et al.*, 2009). Une seule équipe a, à l'heure actuelle, mesuré les taux présents dans le sang du cordon ombilical et a mis en évidence des taux pouvant aller jusqu'à  $10^{-5} \text{M}$  ce qui représente des quantités extrêmement importantes de MEHP (Latini *et al.*, 2003) (Tableau 5).

Certaines études ont montré que les enfants étaient également soumis à des taux de phtalates plus élevés que la moyenne de la population, environ 4 fois plus pour des enfants de 1 à 5 ans, et 3 fois plus pour des enfants de 6 à 11 ans (Fabjan *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2006). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces données, tout d'abord la proximité dans l'environnement du jeune enfant de nombreux éléments contenant des phtalates, notamment l'ensemble des jouets contenant des PVCs et pouvant être mis à la bouche. Cette proximité associée à une masse corporelle plus faible peut expliquer ces mesures élevées des taux de phtalates. Il est également possible que des différences de métabolisme entre enfant et adulte soient la cause de ces mesures. En effet, les enfants en bas âge possèdent une capacité d'oxydation plus élevée que les adultes (Becker *et al.*, 2004), ce qui expliquerait un profil de métabolisation et donc d'élimination des phtalates différent.

### II.1.2.3. Potentiels effets additifs.

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 (Revue dans Rider *et al.*, 2010).

Au niveau européen, l'EFSA (European Food Safety Agency) a défini la TDI (Tolerable Daily Intake) qui correspond à la dose journalière maximum qu'un individu peut ingérer sans risque (Wittassek *et al.*, 2007). Toutefois, cette notion de TDI est établie pour chaque phtalate 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) (Swan *et al.*, 2005; Main *et al.*, 2006; Hogberg *et al.*, 2008). Cette notion d'additivité d'un effet délétère des phtalates sur le système reproducteur a été démontrée dans les modèles rongeurs. L'administration à des rattes gestantes, de mélanges

composées de plusieurs phtalates à des doses individuelles faibles et sans effet, entraîne chez le fœtus, l'apparition d'anomalies de la fonction de reproduction imputables à l'effet cumulatif de ces faibles doses de phtalates (Howdeshell *et al.*, 2008a; Howdeshell *et al.*, 2008b).

Dans le cadre de l'évaluation des risques encourus par les populations humaines, ces données obligent à reconsidérer la notion de TDI afin de l'assimiler à la potentialité d'une exposition à de multiples molécules dont la dose cumulée dépasse très certainement la TDI fixée pour une molécule seule (Wittassek and Angerer, 2008).

## II.2. Toxicité des phtalates sur l'organisme.

La toxicité des phtalates sur l'organisme est un fait suspecté et examiné depuis de nombreuses années. En se basant à la fois sur les modèles animaux expérimentaux ainsi que sur les études épidémiologiques chez l'Homme, un grand nombre d'équipes ont démontré les effets délétères de ces composés dans différents organes, notamment le foie, la thyroïde ainsi que l'appareil reproducteur.

### II.2.1 Effets des phtalates sur le foie.

Le foie est le premier organe cible identifié de l'effet délétère des phtalates. Chez les rongeurs adultes, l'effet le plus évident d'une contamination chronique au DEHP par voie orale se traduit par une hépatomégalie prononcée, conséquence d'une hyperplasie et d'une hypertrophie des hépatocytes (Lake *et al.*, 1975; Reddy *et al.*, 1976). Ceci s'accompagne d'une accumulation de lipides ainsi que de granules de lipofuscine (Mitchell *et al.*, 1985; Ward *et al.*, 1998). L'hyperplasie des hépatocytes est due à l'action combinée de l'augmentation de la prolifération et l'inhibition de l'apoptose de ces cellules (Smith-Oliver and Butterworth, 1987; James *et al.*, 1998), alors que l'hypertrophie est plutôt le résultat d'une augmentation du nombre et de la taille des organelles intracellulaires (mitochondries, lysosomes et peroxyosomes) (Nair and Kurup, 1987). Des cultures d'hépatocytes de rat ont également montré une augmentation de la réplication de l'ADN de ces cellules couplée à une suppression de leur apoptose (Goll *et al.*, 1999; Hasmall *et al.*, 1999). D'autres études ont montré que l'exposition chronique (de 79 à 104 semaines) à de très fortes doses de DEHP (3-12g/kg) peut entraîner chez le rat comme chez la souris l'apparition de carcinomes hépatiques

(Kluwe *et al.*, 1982; David *et al.*, 1999), néanmoins, ces effets délétères peuvent être réversibles après arrêt du traitement (David *et al.*, 1999).

Au niveau fœtal, l'exposition *in utero* au DEHP (25 et 100 mg/kg/jour) de souris entre 11 et 19 jpc entraîne une augmentation de l'hépatostéatose (rétention des triglycérides dans les vacuoles hépatocytaires) ainsi que la réduction du stockage du glycogène dans le foie des fœtus, et ce de manière dose dépendante (Maranghi *et al.*, 2010). Récemment, une équipe a montré que l'exposition *in utero* au Di-n-Propyl-Phtalate (DnPP) à 1500 mg/kg/jour provoquait une hépatomégalie chez le fœtus ainsi que l'activation d'enzymes du peroxysome (Saillenfait *et al.*, 2011).

Les études réalisées sur les primates (singe et marmouset) n'ont pas mis en évidence d'effet délétère des phtalates sur le foie dans ces modèles (Short *et al.*, 1987; Kurata *et al.*, 1998). De même, les études de corrélation réalisées sur la toxicité des phtalates dans le foie chez l'Homme n'ont pas démontré de liens entre les taux d'exposition et une quelconque altération hépatique. Les quelques groupes qui ont étudié l'action du MEHP sur des cultures d'hépatocytes humains concluent à une absence d'effet sur la prolifération ou l'apoptose de ces cellules, ainsi que sur l'induction d'enzymes du peroxysome (Goll *et al.*, 1999; Hasmall *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2005; Rusyn *et al.*, 2006). Ainsi, la sensibilité hépatique aux phtalates dépendrait de l'espèce.

### II.2.2 Effets des phtalates sur la thyroïde et le système immunitaire.

Outre le foie, cible privilégiée des phtalates, ces composés sont également connus pour leur incidence néfaste sur d'autres fonctions biologiques de l'organisme. Il n'existe toutefois qu'une faible documentation relative à ces effets.

Au niveau de la thyroïde, deux études montrent que l'exposition de rats adultes au DBP ou DEHP induit une diminution de la production d'hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Hinton *et al.*, 1986; O'Connor *et al.*, 2002). Chez l'Homme, seules quelques études épidémiologiques mettent en évidence une corrélation entre des taux de phtalates élevés et un dysfonctionnement de la fonction thyroïdienne. Huang et collaborateurs montrent une corrélation entre les taux de MBP chez la femme enceinte et une diminution de l'hormone T4 libre et totale (Huang *et al.*, 2007). De même, Meeker et collaborateurs mettent en évidence une corrélation entre les taux de MEHP chez l'Homme adulte et la diminution de la fraction libre des hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Meeker *et al.*, 2007). Finalement une étude

récente a mesuré les taux de différents phtalates chez des enfants danois de 4 à 9 ans et montre, chez les filles, une corrélation inverse entre ces taux de phtalates et les taux d'hormone T3 pour les fractions libres et totales. Chez les garçons, une tendance est observable mais n'est pas significative (Boas *et al.*, 2010).

Les phtalates sont également suspectés d'agir sur le système immunitaire en jouant un rôle d'adjuvant à l'origine de réactions allergiques. Dans un modèle de souris favorables aux réactions allergiques, le traitement au DEHP de femelles gestantes entraîne sur la descendance mâle une accélération de la différenciation des cellules impliquées dans la réaction allergique (Koike *et al.*, 2009). Une seconde étude montre que l'effet adjuvant du DEHP chez la souris adulte est strictement restreint à la surproduction d'anticorps de types IgG1 (impliqués dans la cytotoxicité des anticorps) (Larsen and Nielsen, 2008).

### II.2.3 Effets sur la fonction de reproduction.

Les phtalates sont surtout étudiés pour leur toxicité sur la fonction de reproduction mâle et femelle et le développement de cette fonction au cours de la grossesse. Ce point est celui qui suscite le plus de débat et d'effervescence, soulevant un problème majeur de santé publique aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis, en raison de la très grande variété et du large champ d'utilisation de ces molécules.

#### II.2.3.1. Chez l'animal.

La notion de toxicité des phtalates sur la fonction de reproduction n'est pas récente et a été étudiée dans différents modèles animaux et notamment chez les rongeurs (et plus particulièrement chez le rat) qui s'avèrent être des modèles privilégiés dans les études toxicologiques sur la fonction de reproduction. Dans le paragraphe suivant, nous compilerons les données connues de l'effet des phtalates dans les différentes espèces animales en fonction de la période d'exposition.

##### a. Exposition de l'individu prépubère et adulte.

En ce qui concerne la fonction de reproduction femelle, l'équipe de Ma et collaborateurs montre que l'exposition par inhalation au DEHP (25 mg/m<sup>3</sup>/jour) pendant la

phase pubertaire induit une accélération du développement pubertaire qui se traduit par un avancement de l'âge de l'ouverture vaginale ainsi que du premier œstrus des rattes. Cette accélération du développement pubertaire se traduit par une élévation des taux d'œstradiol, de LH et de cholestérol dans le plasma sanguin (Ma *et al.*, 2006). A l'inverse, d'autres équipes ont montré que l'exposition à différents phtalates par voie orale (DEHP 500 mg/kg/jour ; MEHP 25-50mg/kg ; Di-Propyl Phtalate (DPP) 300-900 mg/kg/jour ; DBP 500mg/kg/jour) provoquait une augmentation de la mort *in utero* des fœtus accompagnée de cas d'avortements spontanés (Tomita *et al.*, 1986; Gray *et al.*, 2006; Howdeshell *et al.*, 2008a). On observe également un allongement des cycles d'œstrus des rattes de 20 jpp (jours post partum) ainsi que l'apparition d'ovaires polykystiques, l'anovulation et une infertilité des animaux, symptômes qui s'accompagnent d'une réduction des taux plasmatiques d'œstradiol et de progestérone (Davis *et al.*, 1994; Lovekamp-Swan and Davis, 2003; Svechnikova *et al.*, 2007). Il est donc difficile de conclure quant à un effet pro-œstrogénique ou anti-œstrogénique des phtalates sur l'ovaire adulte. Il a également été montré que le traitement au DEHP entraîne également une augmentation du nombre de follicules atrétiques au sein de l'ovaire de ratte (Grande *et al.*, 2007).

*In vitro*, deux études basées sur des cultures de cellules de la granulosa de rat ont montré que le traitement au MEHP inhibait à la fois l'accumulation d'AMPc induite par la FSH ainsi que la production de progestérone par ces cellules (Treinen *et al.*, 1990; Lovekamp and Davis, 2001). De plus, le DEHP (1-100µg/L) et son métabolite actif le MEHP (0,1-10µg/L) induisent une suppression de la production d'œstradiol par les cellules de la granulosa de souris en culture (Gupta *et al.*, 2010).

Concernant la fonction de reproduction de l'individu mâle, le gavage de rat prépubère avec du DEHP à 1g/kg/jour entraîne une modification de l'expression de la connexine 43 ainsi que de l'occludine et de la zona occludens (ZO-1) impliquées dans la constitution de la barrière hémato-testiculaire (Sobarzo *et al.*, 2009). De même, le gavage avec du Di-iso-Butyl Phtalate (DiBP) altère les filaments de vimentine des cellules de Sertoli (Zhu *et al.*, 2010). Ces résultats corrént avec des données obtenues chez la souris adulte qui montrent que le gavage au MEHP (1g/kg/jour) provoque une diminution d'expression de l'occludine ainsi que des intégrine-β1 et laminine-γ3 dans les jonctions serrées des cellules de Sertoli (Yao *et al.*, 2010). Les phtalates peuvent également altérer directement les cellules de Leydig adultes chez le rat. Une étude réalisée par Svechnikov et collaborateurs montre une inhibition de la

production de testostérone, en condition de stimulation par l'hCG, suite à l'exposition au MEHP dans des cultures primaires de cellules de Leydig (Svechnikov *et al.*, 2008).

#### b. Exposition pendant la vie fœtale et néonatale.

Bien que les phtalates puissent agir directement sur la fonction de reproduction de l'individu adulte, il semble que ces composés agissent majoritairement en altérant le développement de cette fonction au cours de la vie fœtale.

Si très peu d'études se sont penchées sur la mise en place et le développement de la fonction de reproduction chez le fœtus femelle, il n'en est pas de même pour le mâle, comme en atteste la multiplicité des études sur ce sujet. On peut regrouper ces études dans deux grandes catégories, les études menées *in vivo* par gavage des femelle gestantes, et les études *in vitro*, généralement réalisées à l'aide de modèles de cultures d'organes ou de cultures cellulaires.

ESPECE	EFFETS DES PHTALATES SUR LES FONCTIONS TESTICULAIRES	
	FONCTION STEROIDOGENE	FONCTION GAMETOGENE
<b>RAT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cryptorchidie</li> <li>- Hypospadias</li> <li>- Réduction de la distance Ano-Génitale</li> <li>- Retard d'acquisition de la puberté</li> <li>- Rétention des aréoles et des tétons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution du poids et de la taille des testicules</li> <li>- Diminution de la quantité et de la qualité spermatique</li> <li>- Baisse de la fertilité</li> <li>- Pas de cancer testiculaire</li> </ul>
<b>SOURIS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Non décrit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Non décrit</li> </ul>
<b>MARMOUSET</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de Cryptorchidie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de baisse de la fertilité</li> </ul>

**Tableau 6 : Effets d'une exposition fœtale aux phtalates sur les fonctions testiculaires néonatale ou adulte en fonction de l'espèce.**

Récapitulatif des symptômes observables à la naissance et à l'âge adulte, dans différentes espèces, après traitement aux phtalates *in vivo* pendant la vie fœtale. Les différents effets sont regroupés en deux catégories: insuffisance fœtale en androgènes (altération de la fonction stéroïdogene) ou altération du développement des cellules germinales (altération de la fonction gamétogene). D'après Fisher et al. 2003; Mylchrest et al. 2000; Mahood et al. 2005; Borch et al. 2004; Saillenfait et al. 2009 et 2010.

*In utero*, l'exposition en fin de vie fœtale et début de vie post-natale, à différents phtalates (DBP, BBP, DEHP pour des doses allant de 100 à 1000mg/kg/jour) entraîne en

premier lieu chez le rat une réduction de la distance ano-génitale de la progéniture mâle (Borch *et al.*, 2004; Tyl *et al.*, 2004; Borch *et al.*, 2005; Christiansen *et al.*, 2010; Saillenfait *et al.*, 2011) (Tableau 6). Les phtalates entraînent également l'apparition de cas d'hypospadias (Foster *et al.*, 2001; Saillenfait *et al.*, 2009) ainsi que de cas de cryptorchidie ou d'anomalies de la descente des testicules (Ema and Miyawaki, 2001; Shono *et al.*, 2005; Saillenfait *et al.*, 2011) (Tableau 6). Ces différents paramètres sont considérés comme des critères fiables de la masculinisation de l'individu car leur développement est fortement sous contrôle de la testostérone. Par ailleurs, d'autres études de gavages de rattes gestantes ont montré que les phtalates induisent un défaut de masculinisation pendant la vie fœtale, qui se traduit par l'apparition à l'âge adulte d'anomalies de la différenciation des caractères sexuels secondaires. En effet, l'exposition au BBP (750 mg/kg/jour) ainsi qu'au DnHP (500 mg/kg/jour) entraîne un retard d'acquisition de la puberté ainsi qu'une rétention des aréoles et tétons et l'apparition de sévères malformations génitales (Tyl *et al.*, 2004; Saillenfait *et al.*, 2009). De même, au niveau de la gonade, le DBP (500mg/kg/jour) ou le DEHP (750 mg/kg/jour) administrés au cours de la vie fœtale provoquent une diminution du poids des testicules et une baisse de la qualité et quantité du sperme, corrélées à une baisse de fertilité (Mylchreest *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003; Mahood *et al.*, 2005; Foster, 2006; Wilson *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2010) (Tableau 6).

- Altération de la fonction stéroïdogène :

Les phtalates, qui sont classés comme toxiques pour la fonction de reproduction, sont également incriminés en tant que perturbateurs endocriniens chez le rat, de par l'altération de la synthèse des stéroïdes qu'ils entraînent. En effet, l'exposition de rattes pendant la phase de gestation à différents phtalates (pour des doses de 100 à 1000 mg/kg/jour) entraîne une diminution de la production de testostérone en fin de vie fœtale (Tableau 7). Ces observations ont été réalisées aussi bien pour une exposition au diester (Akingbemi *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Borch *et al.*, 2006; Culty *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2010) que pour une exposition au métabolite monoesterique principal (Shono *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que Thomson et collaborateurs ont montré qu'en fin de vie fœtale, 48h après arrêt du gavage au DBP, les fœtus mâles présentaient un début de récupération du taux de testostérone. Ceci met en avant la potentielle réversibilité de l'effet des phtalates sur la fonction stéroïdogène (Thompson *et al.*, 2004; Xiao-feng *et al.*, 2009). En parallèle de la diminution de production de testostérone,

l'exposition à différents phtalates, notamment le DEHP (100 mg/kg/jour), le DBP (dès 500 mg/kg/jour) et le Di-isobutyl Phtalate (DiBP, dès 600 mg/kg/jours), entraîne chez le rat un phénomène d'agrégation des cellules de Leydig (Parks *et al.*, 2000; Mahood *et al.*, 2005; Scarano *et al.*, 2010) sous forme de clusters de cellules au centre du testicule (Tableau 7). Cette agrégation peut être accompagnée d'une diminution du nombre total de cellules de Leydig (Lin *et al.*, 2008) ainsi que d'une hyperplasie de ces cellules (Fisher *et al.*, 2003; Borch *et al.*, 2006; Culty, 2009).

Il faut également remarquer que différentes études démontrent un impact variable selon les périodes d'exposition. Par exemple l'exposition *in utero* au DBP entre 7 et 19 jpc entraîne une diminution de la production de testostérone ainsi qu'une altération histologique de la répartition des cellules de Leydig beaucoup moins prononcée que si l'exposition a lieu de 7 à 21 jpc (Borch *et al.*, 2006). De même, une exposition de rats prépubères au DEHP (200 mg/kg/jour) pendant une période de 14 jours entraîne une diminution de la synthèse de testostérone et de l'hormone lutéinisante mais si l'exposition chronique est prolongée sur 28 jours, les auteurs ont constaté une augmentation de la synthèse de ces deux hormones (Akingbemi *et al.*, 2001). Il faut donc considérer l'importance des fenêtres d'exposition pour l'étude des effets des phtalates sur la fonction Leydigienne.

L'ensemble de ces travaux met en évidence une action délétère des phtalates pendant la vie fœtale sur la fonction stéroïdogène du rat, néanmoins, ceci pourrait être spécifique de cette espèce. En effet, les études menées sur l'autre grand modèle de rongeur, la souris, n'ont pas mis en évidence de diminution de la biosynthèse de testostérone ou d'agrégation des cellules de Leydig suite à l'exposition *in utero* aux phtalates (Gaido *et al.*, 2007) (Tableau 7). Les études sur les primates viennent étayer cette hypothèse d'une spécificité du rat quant à un impact des phtalates sur la fonction leydigienne. Le traitement *in utero* de marmouset (*Callithrix jacchus*) au DBP pendant la vie fœtale (500 mg/kg/jour de la 7<sup>ème</sup> à la 15<sup>ème</sup> semaine de gestation) ne modifie pas la synthèse de testostérone (McKinnell *et al.*, 2009) (Tableau 7). Curieusement, ces résultats s'opposent à ceux publiés précédemment par la même équipe, où l'exposition à 500 mg/kg/jour de DBP entraînait une diminution de la production de testostérone ainsi qu'une augmentation du volume total et du nombre de cellules de Leydig dans le testicule fœtal de marmouset (Hallmark *et al.*, 2007).

*In vitro*, les études réalisées chez les rongeurs complètent ces données. Chez le rat, l'exposition de la gonade fœtale à 10<sup>-5</sup>M de MEHP en culture organotypique entraîne une diminution de la production de testostérone dès 48h de traitement. Il faut noter que cette diminution n'est pas retrouvée lors d'un traitement avec le diester correspondant (DEHP)

(Chauvigne *et al.*, 2009) (Tableau 7). Dans le cas de la souris, notre laboratoire a montré que la sécrétion de testostérone fœtale est modulée différenciellement par les phtalates selon les conditions expérimentales. En fin de vie fœtale (18,5 jpc) le MEHP entraîne une diminution de la production de testostérone en présence de LH et l'effet inverse en conditions non stimulées (Lehraiki *et al.*, 2009) (Tableau 7). Ceci renforce la notion de différence inter espèces et l'idée d'une spécificité du rat quant à l'effet délétère des phtalates sur la fonction stéroïdienne. En effet, si les phtalates sont classés comme perturbateurs endocriniens chez le rat, cette définition n'est pas nécessairement vraie dans les autres espèces.

- Altération de la fonction gamétogène :

Concernant la deuxième grande fonction du testicule fœtal, la gamétogenèse qui prend place au sein des cordons séminifères, un très grand nombre d'études décrivent également un effet des phtalates chez les rongeurs sur les différents types cellulaires des cordons.

En premier lieu, plusieurs études ont montré une altération de la structure même des cordons séminifères (Tableau 7). L'exposition de rattes gestantes au DBP (500mg/kg/jour) entre 13 et 21 jpc entraîne l'apparition de zones de dysgénésie des cordons séminifères (Fisher *et al.*, 2003), avec des cordons incomplètement formés comprenant même des zones locales de cellules de Leydig enchâssées au sein de ces cordons (Mahood *et al.*, 2005). Ces anomalies sont accompagnées d'un défaut de maturation des cellules périvitubulaires myoïdes qui forment la structure externe du cordon ainsi qu'un défaut de maturation des cellules de Sertoli, révélé par l'immuno-marquage de la protéine p27(kip) et dans certains cas une vacuolisation des cellules de Sertoli (Borch *et al.*, 2006). Les phtalates diminuent également le nombre de ces cellules (Scott *et al.*, 2007) ainsi que leur prolifération (Auharek *et al.*, 2010), néanmoins cette dernière étude montre que la diminution de prolifération à la naissance est compensée à 25 jpp si l'exposition n'est pas prolongée pendant la période de lactation.

De plus, plusieurs démonstrations expérimentales ont mis évidence un impact des phtalates sur l'interaction entre cellules de Sertoli et cellules germinales. Les filaments de vimentine représentatifs de la communication entre ces cellules voient leur expression altérée alors que la protéine NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et les Cadhérines ont leur localisation modifiée reflétant une altération de la structure des cordons séminifères (Kleymenova *et al.*, 2005) (Tableau 7).

ESPECE		CELLULES DE LEYDIG	CORDONS SEMINIFERES
<b>RAT</b>	<i>In Utéro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la production de testostérone</li> <li>- Agrégation des cellules de Leydig (avec généralement une hyperplasie des cellules)</li> <li>- Localisation anarchique des cellules de Leydig au sein des cordons</li> <li>- Diminution de l'INSL-3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altération de la structure des cordons <ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Défaut de maturation des cellules péricubulaires</li> <li>&gt; Défaut de maturation des cellules de Sertoli</li> </ul> </li> <li>- Diminution du nombre et de la prolifération des cellules de Sertoli</li> <li>- Perturbation de la communication entre cellules de Sertoli et cellules germinales</li> <li>- Diminution du nombre de cellules germinales</li> <li>- Apparition de gonocytes plurinucléés</li> </ul>
	<i>In Vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la production de testostérone</li> <li>- Localisation anarchique des cellules de Leydig au sein des cordons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la prolifération des cellules de Sertoli</li> <li>- Diminution de l'expression de l'AMH</li> <li>- Perte des interactions entre cellules de Sertoli et cellules germinales</li> <li>- Diminution du nombre de cellules germinales (apoptose)</li> </ul>
<b>SOURIS</b>	<i>In Utéro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de diminution de la production de testostérone</li> <li>- Pas d'agrégation des cellules de Leydig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution du nombre de cellules germinales (apoptose)</li> <li>- Apparition de gonocytes plurinucléés</li> </ul>
	<i>In Vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modulation de la production de testostérone variable en fonction des conditions de cultures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution du nombre de cellules germinales</li> <li>- Apparition de gonocytes plurinucléés</li> <li>- Diminution de l'expression de l'AMH</li> </ul>
<b>MARMOSET</b>	<i>In Utéro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de diminution de la production de testostérone (controversé)</li> <li>- Pas d'agrégation des cellules de Leydig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de diminution du nombre de cellules germinales</li> <li>- Cas d'agrégation des cellules germinales</li> </ul>

**Tableau 7 : Effets d'une exposition fœtale aux phtalates sur les différents types cellulaires du testicule fœtal en fonction de l'espèce.**

Ce tableau rassemble les effets d'une exposition *in vitro* ou *in utero* pendant la période fœtale, sur les cellules de Leydig ainsi que sur les cellules composant les cordons séminifères (cellules de Sertoli et cellules germinales). D'après Li et al. 1998, Park et al. 2000, Akingbemi et al. 2001, Li et Kim 2003, Fisher et al. 2003, Lehmann et al. 2004, Thomson et al. 2004, Kleyменова et al. 2005, Mahood et al. 2005, Borch et al. 2006, Ferrara et al. 2006, Gaido et al. 2007, Scott et al. 2007, Hallmark et al. 2007, Lin et al. 2008, Chauvigné et al. 2009, Lehraiki et al. 2009, McKinnell et al. 2009, Scarano et al. 2010.

Les cellules de Sertoli ayant pour fonction, entre autres, d'être un support du développement des cellules germinales, ces données peuvent aisément expliquer la réduction du nombre de cellules germinales observée durant la vie fœtale, comme à l'âge adulte. En effet, le traitement *in utero* de rats aux phtalates entraîne une diminution du nombre de

cellules germinales en fin de vie fœtale (Ferrara *et al.*, 2006). Ceci a également été démontré chez la souris (Gaido *et al.*, 2007) (Tableau 7). L'ensemble de ces données sur la diminution du nombre de cellules germinales (précurseurs de la spermatogénèse adulte) pendant la vie fœtale, et ce dans différents modèles permet d'étayer l'hypothèse d'une origine fœtale de la diminution de production spermatique observable à l'âge adulte. Ferrara et collaborateurs ont d'autre part démontré qu'une exposition au DBP entraînait un retard de différenciation des gonocytes, décalant l'entrée de ces cellules dans leur phase de quiescence (15,5 jpc à 18,5 jpc) avec un maintien prolongé de l'expression du marqueur de pluripotence OCT3/4 (Ferrara *et al.*, 2006). Ce décalage de différenciation des cellules germinales se traduit également par un retard dans la reprise de prolifération de ces cellules à la naissance. Enfin, différentes études ont mis en évidence l'apparition de gonocytes plurinucléés après traitement au DiBP ou DBP *in utero* chez le rat (Kleymenova *et al.*, 2005; Borch *et al.*, 2006; Ferrara *et al.*, 2006; Boekelheide *et al.*, 2009). Ce phénomène particulier semble transitoire puisqu'à l'heure actuelle la présence de ces cellules n'a pas été démontrée à l'âge adulte (Tableau 7).

*In vitro*, différents travaux recourent les données obtenues *in vivo*. En effet, dans un modèle de culture organotypique de testicule de rat, l'exposition au MEHP ( $2.10^{-4}$ M) entraîne une diminution de la prolifération des cellules de Sertoli en fin de vie fœtale et début de vie post-natale. Cette altération des cordons séminifères est corrélée avec la modification de l'expression protéique de différents marqueurs des cellules de Sertoli. En effet, GATA4 et l'AMH voient leur expression diminuer à la fois chez le rat et la souris (Li and Kim, 2003; Chauvigne *et al.*, 2009; Lehraiki *et al.*, 2009). Corroborant ces résultats, Li et collaborateurs ont montré que dans un modèle de co-culture de cellules de Sertoli et de gonocytes de rats prépubères, l'addition de MEHP induit un détachement des cellules germinales du tapis de cellules de Sertoli (Li *et al.*, 1998). Ceci met clairement en évidence la perte d'interaction entre les gonocytes et les cellules de Sertoli (Tableau 7).

Les cellules germinales fœtales sont elles aussi affectées par l'exposition aux phtalates. Le traitement au MEHP ( $10^{-5}$ M à  $2.10^{-4}$ M) en culture organotypique de rat ou de souris provoque une diminution du nombre de cellules germinales en fin de vie fœtale et début de vie post-natale (Li and Kim, 2003; Chauvigne *et al.*, 2009; Lehraiki *et al.*, 2009) (Tableau 7). Cette diminution est la conséquence d'une induction de l'apoptose de ces cellules dans les deux espèces, ainsi que d'une diminution de leur prolifération chez le rat mais qui n'est pas retrouvée chez la souris. Il a également été observé l'apparition de gonocytes plurinucléés chez la souris après traitement au MEHP. Toutefois, il est intéressant de

souligner que ce phénomène semble restreint à une exposition aux phtalates en fin de vie fœtale, puisque le traitement au MEHP entre 12,5 et 15,5 jpc chez la souris n'induit pas de gonocytes plurinucléés (Lehraiki *et al.*, 2009) (Tableau7).

L'hypothèse établie selon laquelle les CIS (Carcinome In Situ) et TGCT (Testicular Germ Cell Tumor) prendraient leur origine lors d'une anomalie de la différenciation ou du développement des gonocytes fœtaux (Rajpert-De Meyts, 2006; Sonne *et al.*, 2009) rend extrêmement pertinent l'ensemble des données sur l'induction d'anomalies du développement des cellules germinales après traitement.

#### II.2.3.2. Chez l'Homme.

Alors que nous venons de voir la multiplicité des études réalisées chez les rongeurs, il n'existe à l'heure actuelle que très peu d'études décrivant la toxicité des phtalates sur la fonction de reproduction chez l'Homme. Dans leur grande majorité, ces études sont d'ailleurs des études épidémiologiques qui mettent en évidence des corrélations entre la mesure du taux de phtalates dans l'organisme et l'apparition de certaines anomalies de la fonction de reproduction. Il existe toutefois quelques rares études expérimentales qui restent très difficiles à mettre en place.

##### a. Fonction de reproduction chez la femme.

Chez la femme, des études de corrélation ont établi un lien entre le taux de phtalates dans les urines de femmes enceintes et l'augmentation de cas de complication pendant la grossesse, tel que l'anémie ou la prééclampsie, ainsi qu'une réduction de la durée de la grossesse (Cobellis *et al.*, 2003; Latini *et al.*, 2003). D'autres études de corrélation ont mis en relation les taux de phtalates retrouvés dans les urines de jeunes filles avec l'apparition d'une puberté précoce (Colon *et al.*, 2000; McKee, 2004), ce qui semble cohérent avec les démonstrations faites chez les rongeurs. Néanmoins ces études restent controversées (Jacobson-Dickman and Lee, 2009; Lomenick *et al.*, 2010).

*In vitro*, une étude expérimentale de culture de cellules de granulosa humaines montre que l'addition de MEHP ( $10^{-4}$ M à  $5.10^{-4}$ M) au milieu de culture provoque une inhibition de la production d'œstradiol et de progestérone, ainsi que de l'activité aromatasase de ces cellules

(Reinsberg *et al.*, 2009). Ceci concorde avec les données décrites chez le rat, que nous avons mentionnées plus haut (Gupta *et al.*, 2010).

#### b. Fonction de reproduction chez l'Homme.

Chez l'Homme, deux études épidémiologiques pionnières de Shanna H. Swan et Katharina M. Main sont véritablement à l'origine des liens supposés entre l'exposition *in utero* aux phtalates et l'apparition d'anomalies de la fonction de reproduction masculine. L'étude de Swan et collaborateurs, réalisée aux Etats-Unis chez des enfants de 2 à 36 mois, a montré une corrélation entre les taux de différents phtalates mesurés dans les urines de la mère avant la naissance et la réduction de l'IAG (Index Ano-Génital), critère de la masculinisation du fœtus (Swan *et al.*, 2005). Parallèlement, l'équipe de Main et collaborateurs, sur une cohorte de garçons danois et finlandais âgés de 3 mois, a mis en évidence une corrélation entre les taux de plusieurs phtalates mesurés dans le lait maternel à la naissance et la modification de plusieurs indicateurs de la masculinisation du nouveau-né. Cette étude montre une corrélation positive avec le niveau de SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) et une corrélation négative avec le rapport LH/ testostérone libre ainsi que le taux de testostérone total (Main *et al.*, 2006). Précisons ici que tous les phtalates mesurés ne montrent pas une corrélation significative, mais tous tendent vers le même résultat.

Ces deux études mettent en évidence un défaut de masculinisation du fœtus au cours de la vie fœtale qui pourrait expliquer l'apparition des anomalies de la fonction de reproduction masculine observables à la naissance ainsi qu'à l'âge adulte.

Il n'existe sur le testicule fœtal humain qu'une seule étude expérimentale de l'effet des phtalates. Hallmark et collaborateurs se sont penchés sur l'impact du DBP sur la fonction stéroïdogène du testicule fœtal humain au deuxième trimestre de la grossesse sans toutefois mettre en évidence une modification de la production de testostérone induite par ce composé (Hallmark *et al.*, 2007).

La multitude des démonstrations expérimentales de l'effet des phtalates sur la mise en place et le développement de la fonction de reproduction masculine du fœtus ainsi que les différentes études épidémiologiques réalisées chez l'Homme, a pleinement justifié mon

travail de thèse dans lequel nous nous sommes intéressés à l'effet du MEHP sur le développement de la gonade fœtale humaine. Les notions de fenêtre de développement et de fenêtre de sensibilité, nous ont amené à nous focaliser sur la gonade fœtale du premier trimestre de la grossesse.

### III. MECANISMES D'ACTION DES PHTALATES.

---

Si l'effet délétère des phtalates sur le développement du testicule fœtal et la mise en place de la fonction de reproduction masculine ne sont plus à démontrer chez les rongeurs, les mécanismes moléculaires qui en sont responsables sont à l'heure actuelle très mal connus. Un certain nombre de données ont néanmoins permis d'établir quelques hypothèses quant à leurs modes d'action.

#### *III.1. Mécanismes d'action cellulaires des phtalates dans le testicule.*

Les travaux expérimentaux décrivant l'impact délétère des phtalates sur le testicule fœtal de rat ont amené à considérer l'altération de la production de testostérone comme l'action majeure de ces composés. Toutefois, les effets concernant les cellules germinales ne sont pas forcément uniquement une conséquence de l'action anti-androgénique des phtalates. En effet, il a été montré *in vitro* chez la souris qu'en fonction des fenêtres d'exposition ou des conditions de culture, la production de testostérone est modulée différenciellement suite à l'exposition aux phtalates alors que la réduction du nombre de cellules germinales est observable dans chacune des conditions (Lehraiki *et al.*, 2009). Il faut dès lors considérer la possibilité de mécanismes différents dans les effets des phtalates sur la fonction stéroïdienne et sur la gamétogenèse.

##### *III.1.1 Mécanismes d'action des phtalates sur les cellules de Leydig.*

Chez le rat, les études d'analyse de gènes par puce à ARN, réalisées par l'équipe de Kevin Gaïdo, ont montré que l'exposition *in utero* à différents phtalates considérés comme reprotoxiques (DEHP, DBP, BBP et DPP), entraîne la modulation de l'expression d'un grand nombre de gènes du testicule fœtal (Shultz *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007).

Les auteurs ont notamment mis en évidence une diminution de l'expression de plusieurs familles de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et des lipides ainsi que des gènes liés à la stéroïdogénèse. Ces données sont largement corroborées par d'autres études qui mettent également en évidence l'inhibition des gènes impliqués dans la régulation et le transport du cholestérol (*SR-B1* (Scavenger Receptor-B1), *StAR* (Steroid Acute Regulatory protein), *PBR* (peripheral benzodiazepin Receptor) ainsi que dans la synthèse de testostérone (*P450scc*, *P450c17*, *3 $\beta$ HSD*) après traitement *in utero* aux phtalates (DBP et DEHP, 500 et 300mg/kg/jour respectivement) (Shultz *et al.*, 2001; Barlow *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Borch *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2008; Struve *et al.*, 2009). C'est donc la diminution d'expression de ces différents acteurs impliqués dans la chaîne de synthèse des stéroïdes qui serait responsable de la baisse de production de testostérone pendant la vie fœtale. Parallèlement, l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol ainsi que dans la stéroïdogénèse n'est pas modifiée *in vivo* chez la souris en absence de modification du taux de testostérone (Gaido *et al.*, 2007). *In vitro*, Lehraiki et collaborateurs montrent que lorsque le MEHP stimule la production de testostérone (conditions basales sans LH), l'expression de certaines enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse telles que *StAR* et *P450c17* est augmentée (Lehraiki *et al.*, 2009). Inversement, lorsque le MEHP entraîne une diminution de la production de testostérone fœtale (conditions stimulées par la LH), l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse est diminuée (Lehraiki *et al.*, 2009).

En revanche, les mécanismes pouvant amener à cette diminution de l'expression génique restent inconnus. Une étude montre toutefois l'importance du facteur de transcription *c/ebp  $\beta$*  (CCAAT / enhancer binding protein beta) dont la liaison aux promoteurs de *SR-B1*, *P450scc* et *P450c17* est très fortement inhibée 24h après traitement au DBP *in utero* (Kuhl *et al.*, 2007b; Kuhl *et al.*, 2007a).

Il est intéressant de noter qu'en période post-natale, chez le rat, le traitement aux phtalates peut se traduire par une augmentation du taux de testostérone. Ceci est dû à une augmentation du nombre de cellules de Leydig ainsi qu'à une augmentation de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse (Akingbemi *et al.*, 2004).

Outre l'effet sur la production de testostérone, l'agrégation des cellules de Leydig apparaît comme caractéristique de l'effet des phtalates.

Pendant la période fœtale, différentes études montrent que l'agrégation des cellules de Leydig n'est pas due à une augmentation du nombre des cellules mais plutôt à une altération de leur répartition dans le testicule, suite à un défaut de migration (Fisher *et al.*, 2003;

Mahood *et al.*, 2005; McKinnell *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008). Par ailleurs, Lin et collaborateurs montrent que le LIF (Leukemia Inhibiting Factor), qui voit l'expression de son ARNm augmenter en réponse au DEHP, induit l'agrégation des cellules de Leydig de rat en culture (Lin *et al.*, 2008). Le LIF est en outre produit en grande majorité par les cellules péricubulaires du testicule adulte (Piquet-Pellorce *et al.*, 2000), ce qui suggère un potentiel effet indirect des phtalates sur les cellules de Leydig par le biais des cellules péricubulaires.

L'agrégation des cellules de Leydig est un phénomène qui semble indépendant de la diminution de testostérone. En effet, le traitement au DEHP pendant la vie fœtale et post natale entraîne la présence de ces agrégats à des doses faibles (10 mg/kg/jour) alors qu'on observe une augmentation de la production de testostérone (Akingbemi *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2008).

### III.1.2 Mécanismes d'action des phtalates sur les cordons séminifères.

L'observation de la diminution du nombre des cellules germinales, de l'augmentation de leur apoptose et de l'apparition de gonocytes plurinucléés après traitement aux phtalates (Fisher *et al.*, 2003; Li and Kim, 2003; Kleymenova *et al.*, 2005; Mahood *et al.*, 2005; Chauvigne *et al.*, 2009; Lehraiki *et al.*, 2009), a soulevé une importante question à l'heure actuelle encore non résolue. S'agit-il d'un effet direct des phtalates sur les cellules germinales ou d'un effet indirect impliquant d'autres types cellulaires du testicule ?

La perte des interactions communicantes entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales est une hypothèse pouvant expliquer l'effet délétère des phtalates sur ces dernières. En effet, l'altération des interactions entre ces deux types cellulaires, mise en évidence par une altération de l'expression des protéines de jonctions communicantes (NCAM, Cadhérines, Vimentine) pourrait être responsable de l'apparition des gonocytes plurinucléés (Kleymenova *et al.*, 2005). De même, un traitement par le MEHP dans un modèle de coculture gonocytes-Sertoli provoque un détachement des gonocytes du tapis de cellules de Sertoli (Li *et al.*, 1998).

Concernant l'apoptose des cellules germinales, des études menées sur des rats pré-pubères âgés de 28 à 44 jpp ainsi que chez la souris de 28 jpp, ont montré l'implication des récepteurs de mort dans le mécanisme d'induction de l'apoptose des cellules germinales par les phtalates. Le traitement au MEHP induit un stress oxydatif des cellules de Sertoli, ce qui

entraîne la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et la diminution des antioxydants (acide ascorbique et glutathione) dans ces dernières. Ceci a pour conséquence la phosphorylation de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-Kappa B) par Akt1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B – Fas/FasL (Richburg *et al.*, 2000; Rasoulpour and Boekelheide, 2005; Rogers *et al.*, 2008). Cette activation de NF- $\kappa$ B inhibe les TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2) provoquant ainsi une activation des MMP2 (Metalloproteinase-2) et la production de FasL (Yao *et al.*, 2009). L'activation des MMP2 va dégrader les jonctions communicantes (laminine/intégrine) entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales et favoriser ainsi leur détachement alors qu'en parallèle, FasL sécrété par les cellules de Sertoli va se fixer sur son récepteur Fas localisé à la membrane cytoplasmique des cellules germinales ce qui déclenchera leur apoptose (Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Rasoulpour and Boekelheide, 2005). Yao et collaborateurs montrent, en parallèle, une augmentation de la production de TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) dans les cellules de Sertoli, à la fois *in vitro* et *in vivo*, en réponse au traitement par le MEHP. Cette surproduction pourrait être également responsable de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Yao *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2009).

L'implication de la voie Fas/FasL dans l'apoptose des cellules germinales a été confirmée par l'absence d'effet du MEHP sur des souris *gld* (generalized lymphoproliferative disease) exprimant un FasL non fonctionnel (Richburg *et al.*, 2000). En outre, le promoteur de FasL contient un site de fixation pour NF- $\kappa$ B et ce dernier est activé par les ROS (Chan *et al.*, 1999; Kasibhatla *et al.*, 1999). Plus récemment, l'utilisation de souris invalidées pour FasL a montré que le traitement au MEHP à 28 jpp entraînait tout de même une diminution du nombre de cellules germinales parallèlement à l'élévation du niveau de la protéine c-FLIP (FLICE-like inhibitory protein) (Lin *et al.*, 2010a). Le système Fas/FasL n'est donc peut être pas l'unique médiateur de l'apoptose des cellules germinales, et l'étude de l'implication des différents récepteurs de mort (DR5, etc.) serait indispensable.

Actuellement on ne dispose d'aucune information sur les voies apoptotiques activées par les phtalates dans le testicule pendant la vie fœtale. On ne sait donc pas si ces voies sont identiques ou différentes de celles activées dans le testicule prépubère. En conclusion, les études réalisées *in vivo* et *in vitro* chez les rongeurs ont montré que les effets délétères des phtalates sur le testicule sont très complexes, dépendent de l'espèce et du stade d'exposition et font probablement intervenir plusieurs mécanismes différents. Nos travaux préliminaires ont remis en question l'implication de ces différents mécanismes dans le testicule fœtal

humain. Il a donc été nécessaire de rechercher l'implication d'autres acteurs dans l'effet des phtalates sur le testicule foetal humain.

### III.2. Implication des récepteurs nucléaires dans les effets des phtalates.

C'est certainement dans le foie que les mécanismes d'action des phtalates sont le plus décrits. Dans cet organe, il a été démontré que les phtalates peuvent moduler l'activité et/ou l'expression des récepteurs nucléaires. Ces molécules ayant un rôle fondamental dans la régulation d'un grand nombre de processus physiologiques, il nous a paru intéressant de rechercher l'implication des ces récepteurs dans les effets des phtalates sur le testicule.

#### III.2.1 Généralités à propos des récepteurs nucléaires.

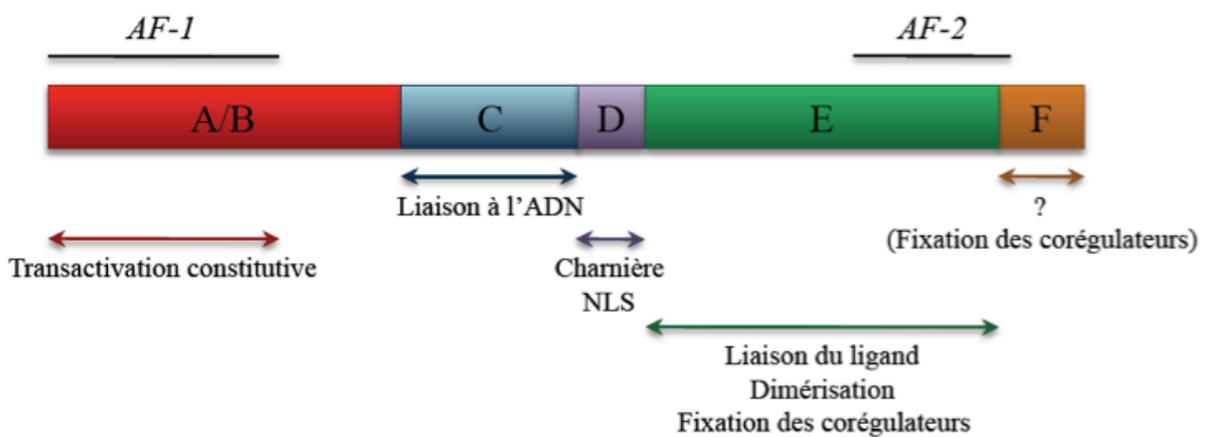
Les récepteurs nucléaires (RNs) sont définis comme des facteurs de transcription dont l'activité de régulation transcriptionnelle est dépendante de la liaison d'un ligand spécifique. Ils sont impliqués dans la régulation d'un grand nombre de processus physiologiques au sein de l'organisme, comme le développement et la reproduction, le métabolisme des lipides, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose (Bookout *et al.*, 2006). Ces molécules semblent caractéristiques du règne animal et sont absentes des plantes et autres algues (Escriva *et al.*, 1998). Il existe actuellement 47, 48 et 49 récepteurs nucléaires connus chez le rat, l'Homme et la souris respectivement (Zhang *et al.*, 2004).

##### III.2.1.1. Structure moléculaire.

Les différents membres qui composent la superfamille des récepteurs nucléaires se définissent par une structure moléculaire commune largement conservée, composée de 4 à 5 domaines spécifiques nommés de A/B à F (Sonoda *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010) (Figure 16).

Deux de ces domaines (C et E) ont une fonction bien définie. Le premier domaine C situé au centre de la séquence polypeptidique intervient dans la liaison à l'ADN du RN. Ce domaine, qui contient deux motifs en doigts de Zinc, spécifiques de cette superfamille, permet l'adressage du RN à la séquence d'ADN qui lui est spécifique, appelée HRE pour « Hormone Response Element ». Le deuxième domaine dont la fonction est clairement définie, se situe

dans la partie C-terminale de la séquence peptidique et est appelé domaine E. Ce domaine contient une région LBD pour « Ligand Binding Domain » intervenant dans la liaison du ligand au RN. Il contient également une région impliquée dans le phénomène de dimérisation du RN ainsi qu'une région AF-2 (Activation Function-2) impliquée dans la liaison des co-régulateurs du récepteur nucléaire. Certains RN possèdent un domaine F positionné à l'extrémité C-terminale et dont la fonction est à l'heure actuelle inconnue, mais qui pourrait intervenir avec AF-2 dans la liaison des co-régulateurs (Figure 16).



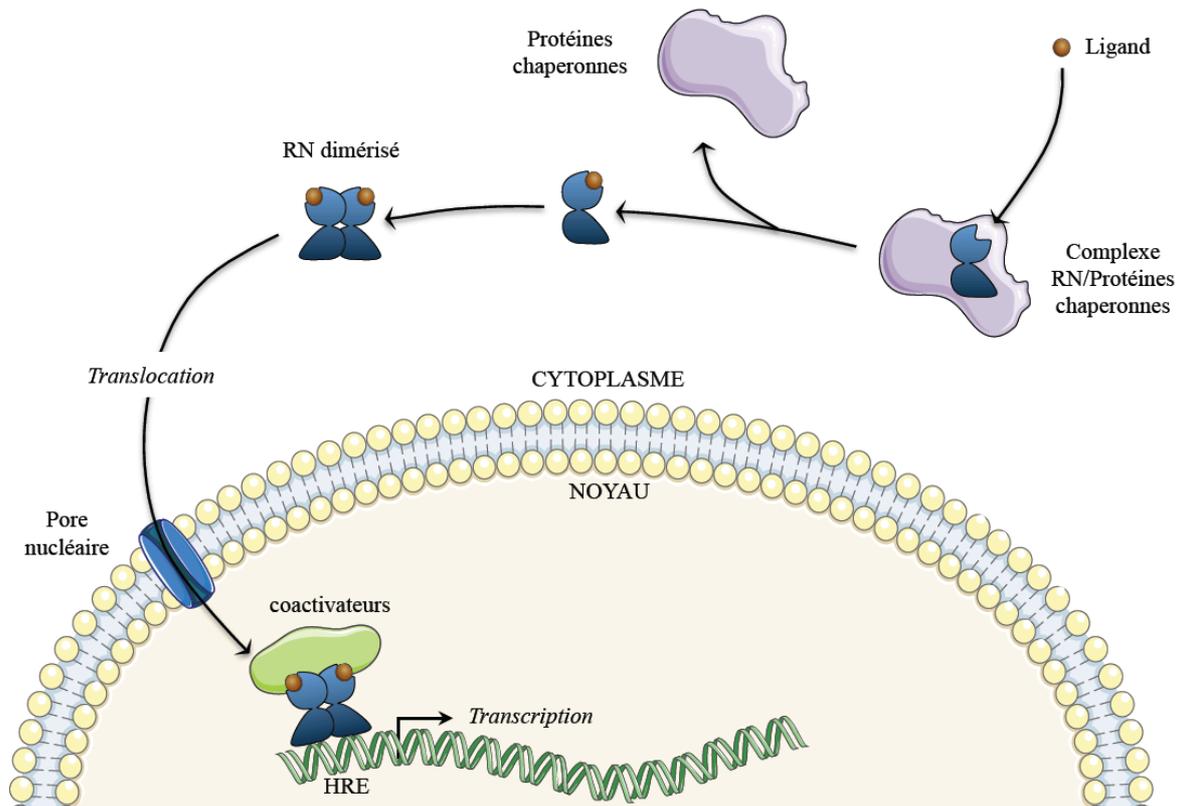
**Figure 16 : Structure générale des récepteurs nucléaires.**

Représentation schématique de la structure générale et des fonctions principales des différents domaines des récepteurs nucléaires. NLS: Nuclear Localisation Sequence. D'après Sonada et al. 2008; Huang et al. 2010.

Les RNs sont également caractérisés par la présence en N-terminale d'un domaine A/B hautement variable en terme de longueur et de séquence nucléotidique entre les différents récepteurs nucléaires. Pour certains récepteurs nucléaires, ce domaine A/B contient une région AF-1, connue pour être une région possédant une activité transcriptionnelle indépendante de la fixation d'un ligand. Enfin, les RNs possèdent également un court domaine D charnière, autorisant une certaine flexibilité de la structure du RN dimérisé, lui permettant ainsi d'interagir avec différentes séquences HRE. C'est également dans ce domaine D que se situe le NLS (Nuclear Localisation Sequence) servant à l'adressage du RN dans le noyau de la cellule (Figure 16).

### III.2.1.2. Modes de fonctionnement des récepteurs nucléaires.

Il existe fondamentalement deux grands modes de fonctionnement des récepteurs nucléaires, qui dépendent de la localisation du récepteur en absence du ligand (revue dans Sonoda *et al.*, 2008).



**Figure 17 : Mode de fonctionnement général des récepteurs nucléaires séquestrés dans le cytoplasme.**

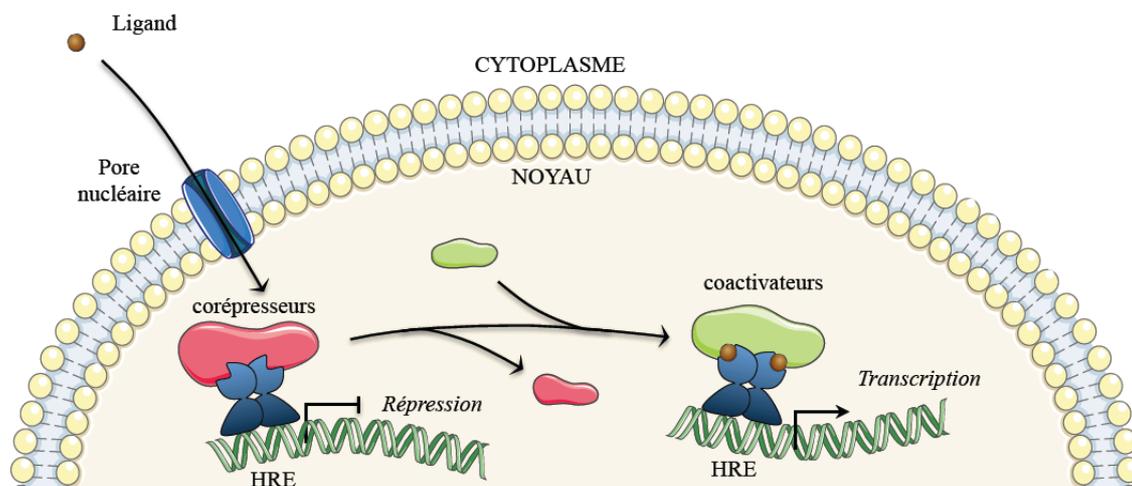
La liaison du ligand entraîne la libération du RN par les protéines chaperonnes. Le RN se dimérise et est transloqué dans le noyau, où la fixation des coactivateurs permet la liaison du complexe sur l'élément de réponse spécifique et le démarrage de la transcription du gène cible. D'après Sonoda *et al.* 2008. Chambraud *et al.* 1990, Nilson *et al.* 2001.

Dans un premier cas, les RNs peuvent être maintenus inactifs dans le cytoplasme par la fixation de protéines chaperonnes (Heat Shock Protein et immunophilines) (Catelli *et al.*, 1985; Pratt and Toft, 1997). La présence de ces protéines chaperonnes dans le complexe du récepteur inactif est fondamentale pour la liaison du ligand (Chambraud *et al.*, 1990). La fixation du ligand dans la cavité hydrophobe du domaine LBD va entraîner une modification allostérique de la structure du récepteur, permettant la libération des protéines chaperonnes. Le RN va ensuite se dimériser en hétérodimère ou homodimère et être transloqué dans le noyau. Le dimère se fixe ensuite sur sa séquence HRE spécifique localisée dans le promoteur

des gènes dont le RN assure la régulation transcriptionnelle. La nature de cette régulation transcriptionnelle est dépendante de la nature de l'homo ou hétérodimère ainsi que de la liaison des co-régulateurs à la séquence AF-2 du RN (McKenna and O'Malley, 2001; Nilsson *et al.*, 2001) (Figure 17).

Dans un second cas de figure, les RNs peuvent se trouver transloqués dans le noyau directement après leur synthèse dans l'appareil de Golgi. Le récepteur nucléaire fixe alors constitutivement sa séquence HRE dans le promoteur du gène cible et forme un complexe avec différents corépresseurs inhibant la transcription du gène (Rosenfeld *et al.*, 2006). La liaison du ligand entraîne une modification conformationnelle de la région AF-2, ce qui libère les corépresseurs et permet la fixation des coactivateurs nécessaires à la régulation transcriptionnelle positive des gènes cibles (Baxter *et al.*, 2004; Nagy and Schwabe, 2004) (Figure 18).

Dans certains cas, la région AF-2 est bloquée dans une conformation telle que le RN devient constitutivement actif. Dans ce cas de figure, l'activité du récepteur nucléaire est modulée par la disponibilité nucléaire du RN lui-même, ou par différentes modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou l'acétylation du récepteur.



**Figure 18 : Mode de fonctionnement général des récepteurs nucléaires séquestrés dans le noyau.**

Le dimère (homo ou hétérodimère) est fixé de façon constitutive à son élément de réponse spécifique. La liaison du ligand entraîne le relargage des corépresseurs et la fixation des coactivateurs qui vont permettre le démarrage de la transcription des gènes cibles. D'après Rosenfeld *et al.* 2006, Baxter *et al.* 2004, Sonoda *et al.* 2008.

Il existe également une voie d'action « non génomique » des récepteurs nucléaires n'impliquant pas la fixation du RN sur sa séquence HRE ainsi qu'une régulation

transcriptionnelle. En effet, différentes études ont montré la capacité de certains récepteurs nucléaires de se fixer directement à d'autres protéines dans le cytoplasme (Gronemeyer *et al.*, 2004). Entre autres, il a été montré que les corticostéroïdes pouvaient directement interagir avec la eNOS (endothélial Nitric Oxyde Synthase) et que le récepteur des œstrogènes interagissait directement avec la sous-unité régulatrice de la PI3K (PhosphoInositide 3 Kinase) (Simoncini *et al.*, 2000; Hafezi-Moghadam *et al.*, 2002). Toutefois, ce mode d'action est à l'heure actuelle très peu décrit.

### III.2.1.3. Classification des récepteurs nucléaires.

Il existe plusieurs méthodes de classification des récepteurs nucléaires en fonction de leur mode de fonctionnement ou en fonction de la nature de leur ligand (récepteurs aux stéroïdes, récepteurs non stéroïdiens, récepteurs orphelins). Toutefois, dans les années 2000, la classification des récepteurs nucléaires a été repensée en terme d'homologie de structure.

De fait, les différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires présentent de fortes homologies de structure. En alignant les séquences des domaines C, D et E des différents récepteurs nucléaires, Laudet a établi un arbre phylogénique de l'évolution des RNs au cours du temps (Laudet, 1997). En s'appuyant sur ces données phylogéniques, le *Nuclear Receptor Nomenclature Committee* a proposé une classification des récepteurs nucléaires en six grandes familles d'homologies de structure, subdivisées ensuite en plusieurs sous catégories (Giguere, 1999; NRNC, 1999) (Tableau 8).

FAMILLE	GROUPE	MEMBRE	ACRONYME	NOM
NR1	A	NR1A1	TR $\alpha$	Thyroid hormone Receptor alpha
		NR1A2	TR $\beta$	Thyroid hormone Receptor beta
	B	NR1B1	RAR $\alpha$	Retinoic Acid Receptor alpha
		NR1B2	RAR $\beta$	Retinoic Acid Receptor beta
		NR1B3	RAR $\gamma$	Retinoic Acid Receptor gamma
	C	NR1C1	PPAR $\alpha$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor alpha
		NR1C2	PPAR $\beta/\delta$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor beta
		NR1C3	PPAR $\gamma$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor gamma
	D	NR1D1	Rev-ErbA $\alpha$	Reverse ErbA alpha
		NR1D2	Rev-ErbA $\beta$	Reverse ErbA beta
	F	NR1F1	ROR $\alpha$	RAR-related Orphan Receptor alpha
		NR1F2	ROR $\beta$	RAR-related Orphan Receptor beta
		NR1F3	ROR $\gamma$	RAR-related Orphan Receptor gamma
	H	NR1H2	LXR $\beta$	Liver X Receptor beta
		NR1H3	LXR $\alpha$	Liver X Receptor alpha
		NR1H4	FXR	Farnesoid X Receptor
	I	NR1I1	VDR	Vitamin D Receptor
		NR1I2	PXR	Pregnane X Receptor
NR1I3		CAR	Constitutive Androstane Receptor	

NR2	A	NR2A1	HNF4 $\alpha$	Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha
		NR2A2	HNF4 $\beta$	Hepatocyte Nuclear Factor 4beta
	B	NR2B1	RXR $\alpha$	Retinoid X Receptor alpha
		NR2B2	RXR $\beta$	Retinoid X Receptor beta
		NR2B3	RXR $\gamma$	Retinoid X Receptor gamma
	C	NR2C1	TR2	Testicular Receptor 2
		NR2C2	TR4	Testicular Receptor 4
	E	NR2E1	TLX	drosophila Tailless homologue
		NR2E3	PNR	Photoreceptor-specific Nuclear Receptor
	F	NR2F1	COUP-TFI	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I
NR2F2		COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II	
NR2F6		EAR-2	ErbA2-Related gene-2	
NR3	A	NR3A1	Era	Estrogen Receptor alpha
		NR3A2	Er $\beta$	Estrogen Receptor beta
	B	NR3B1	ERR $\alpha$	Estrogen receptor-Related Receptor alpha
		NR3B2	ERR $\beta$	Estrogen receptor-Related Receptor beta
		NR3B3	ERR $\gamma$	Estrogen receptor-Related Receptor gamma
	C	NR3C1	GR	Glucocorticoid Receptor
		NR3C2	MR	Mineralocorticoid Receptor
		NR3C3	PR	Progesterone Receptor
		NR3C4	AR	Androgen Receptor
	NR4	A	NR4A1	NGFIB
NR4A2			NURR1	NUR Related factor 1
NR4A3			NOR1	Neuron-derived Orphan Receptor 1
NR5	A	NR5A1	SF1	Steroidogenic Factor 1
		NR5A2	LRH-1	Liver Receptor Homologous protein 1
NR6	A	NR6A1	GCNF	Germ Cell Nuclear Factor
NR0	B	NR0B1	DAX1	Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region on X chromosome gene 1
		NR0B2	SHP	Small Heterodimer Partner

**Tableau 8 : Nomenclature et classification des récepteurs nucléaires humains selon leur homologie de structure.**

Cette classification des récepteurs nucléaires, proposée par le *Nuclear Receptor Nomenclature Committee*, se base sur l'analyse des homologies de séquence des domaines C, D et E. Il existe, chez l'Homme, 48 récepteurs nucléaires classés en sept sous-familles, de NR0 à NR6. D'après NRNC 1999, Giguère 1999

Les récepteurs de type NR1 correspondent à la plus grande des six familles, elle regroupe entre autres les récepteurs des hormones thyroïdiennes, les RARs (Retinoic Acid Receptor) ainsi que les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) et les LXRs (Liver X Receptor). L'ensemble des récepteurs des stéroïdes (androgènes, œstrogènes, progestérone et corticostéroïdes) est regroupé dans la famille des récepteurs NR3. Il est à noter qu'une 7<sup>ème</sup> catégorie de récepteurs nucléaires existe, les récepteurs NR0 comprenant deux membres, NR0B1 (DAX1) et NR0B2 (Small Heterodimer Partner) qui ne possèdent chacun qu'un seul des domaines conservés C ou E (Giguere, 1999; NRNC, 1999) (Tableau 8).

### III.2.2 Implication des récepteurs nucléaires dans les mécanismes d'actions liés au phtalates.

#### III.2.2.1. La voie des PPARs.

Il est maintenant de plus en plus admis que les phtalates peuvent être des activateurs de la voie des récepteurs nucléaires PPARs. Cette famille des PPARs comprend trois membres, PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) et PPAR $\gamma$  (NR1C3). Les PPARs sont impliqués dans la régulation de différents processus physiologiques et tout particulièrement dans la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol ainsi que dans la synthèse des acides gras (revue dans Berger *et al.*, 2005).

La médiation de l'effet délétère des phtalates par les PPARs a surtout été mise en évidence dans le foie. En effet, cet organe est une cible privilégiée des phtalates, qui induisent une augmentation de la prolifération et une inhibition de l'apoptose des hépatocytes, aboutissant à une hépatomégalie et à l'apparition d'hépatocarcinomes (revue dans Rusyn *et al.*, 2006).

Plusieurs études de liaison, dans des modèles d'hépatocytes humains transfectés avec un plasmide rapporteur pour les différents PPARs, ont montré que les phtalates étaient à même d'activer directement les différents membres de la famille des PPARs humains, avec une activation préférentielle de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Hurst and Waxman, 2003; Lapinskas *et al.*, 2005). En parallèle, une autre étude réalisée sur des lignées de carcinomes hépatiques a comparé la sensibilité d'activation des PPARs murin et humain par différents phtalates. Les auteurs ont montré que d'une manière générale, PPAR $\alpha$  était activé avec une plus grande sensibilité chez la souris que chez l'Homme. En revanche, l'activation de PPAR $\gamma$  est observable pour des concentrations similaires chez la souris et chez l'Homme (Bility *et al.*, 2004). D'autres études sur lignées cellulaires ont mis en évidence l'activation par les phtalates des isoformes PPAR chez le rat, la souris et l'Homme (revue dans Corton and Lapinskas, 2005). Il est cependant nécessaire de garder en tête le fait que les expériences de liaison dans les modèles de transfection cellulaire peuvent être éloignées de la physiologie.

Dans le foie de souris, l'effet délétère des phtalates semble entièrement dépendant de l'isoforme PPAR $\alpha$ . En effet, Ward et collaborateurs ont montré chez la souris, que l'inactivation de PPAR $\alpha$  annulait complètement les effets induits par le DEHP dans le foie (Ward *et al.*, 1998). Toutefois cette exclusivité de PPAR $\alpha$  a été récemment remise en question par une équipe qui montre l'induction de gènes hépatiques de la famille des CYP par le

traitement au DEHP sur les souris invalidées pour *PPAR $\alpha$* . Ces effets sont probablement médiés par le récepteur nucléaire CAR (Constitutive-Activated Receptor : NR1I3) (Eveillard *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2010).

Les PPARs jouent également un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique en contrôlant la différenciation des adipocytes ainsi que le stockage des lipides dans le foie et le tissu adipeux (Duplus *et al.*, 2003; Leroyer *et al.*, 2006). Par ailleurs, Feige et collaborateurs ont montré que le MEHP active un PPAR $\gamma$  murin transfecté dans des cellules 3T3 de souris, ce qui induit leur différenciation en adipocytes (Feige *et al.*, 2007). Une étude de corrélation conforte cette hypothèse puisque les auteurs montrent un lien entre les taux de phtalates dans les urines d'Hommes adultes et l'obésité des patients (Stahlhut *et al.*, 2007). Les travaux de Feige et collaborateurs soulèvent également une notion importante. En effet, les auteurs montrent que seuls certains gènes cibles des PPARs voient leur expression modifiée. L'implication des PPARs dans les mécanismes d'action des phtalates est très certainement modulable en fonction de la présence des coactivateurs et corépresseurs de ces récepteurs nucléaires (Feige *et al.*, 2007).

Au niveau testiculaire, l'expression chez l'Homme des différentes isoformes des PPARs a été très peu étudiée. PPAR $\alpha$  est exprimé dans les cellules de Leydig et les spermatoocytes du testicule adulte, en revanche son expression est absente des cellules de Sertoli. La présence de PPAR $\beta$  et PPAR $\gamma$  a été mise en évidence dans des homogénats de testicule total, bien que cette donnée soit controversée pour PPAR $\gamma$  (Elbrecht *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1999; Hase *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, aucune étude ne décrit l'expression des PPARs dans le testicule fœtal humain. Chez le rat, l'isoforme PPAR $\alpha$  est décrite dans les cordons séminifères et les cellules interstitielles dès la naissance (Schultz *et al.*, 1999).

Le traitement chronique de souris adultes au DEHP entraîne un certain nombre d'anomalies de l'appareil reproducteur avec entre autres une diminution de la spermatogenèse ainsi que l'apparition de lésions au niveau des tubules séminifères. L'étude de Ward et collaborateurs a montré que les souris invalidées pour *PPAR $\alpha$*  présentaient, suite au traitement par le DEHP, une altération du tractus génital beaucoup plus modérée que les souris non mutantes (Ward *et al.*, 1998). PPAR $\alpha$  semble être responsable d'une grande partie des effets délétères des phtalates sur le testicule adulte mais l'implication des autres isoformes n'est absolument pas exclue et reste à vérifier. De plus, l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  est augmentée après traitement au DBP (750 mg/kg/jour) dans le testicule post-natal de rat (Ryu *et al.*, 2008).

Au niveau du testicule fœtal, le traitement au DEHP et au DiBP entre 7 et 21 jpc chez le rat, a montré une diminution de l'expression de l'ARNm de *PPARα* ainsi que de l'expression protéique de *PPARγ* au niveau des cellules de Leydig (Borch *et al.*, 2006; Boberg *et al.*, 2008).

Ainsi, l'activité et/ou l'expression des PPARs semblent être modulées par les phtalates dans différents modèles, y compris le testicule fœtal lors d'une exposition *in utero*. Par ailleurs, la capacité des PPARs à réguler le métabolisme et le transport du cholestérol (Xie *et al.*, 2002), précurseur de la chaîne de synthèse des stéroïdes et donc de la testostérone, peut expliquer la diminution du taux de testostérone fœtale observée lors de l'exposition *in utero* aux phtalates. Chez l'Homme, le traitement clinique avec la troglitazone ou la rosiglitazone, deux drogues activatrices de *PPARγ*, induit une diminution du taux de testostérone chez l'adulte (Bloomgarden *et al.*, 2001; Vierhapper *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces données fait des PPARs d'excellents candidats pour une implication éventuelle dans les mécanismes d'action des phtalates, responsables de l'altération de la fonction de reproduction au cours de la vie fœtale.

#### III.2.2.2. La voie des récepteurs aux hormones stéroïdes.

Les phtalates sont depuis longtemps suspectés d'être des perturbateurs endocriniens et donc d'interférer avec les hormones endogènes. De ce fait, les différents récepteurs aux hormones stéroïdes appartenant à la famille des récepteurs nucléaires, *ERα* (NR3A1), *ERβ* (NR3A2) et *AR* (NR3C4), sont potentiellement des cibles privilégiées des phtalates.

Il existe un grand nombre d'études qui ont montré que le DBP et le BBP étaient capables de lier *ERα* et d'induire une augmentation de la prolifération des cellules MCF-7, une lignée de cellules du cancer du sein qui exprime un très fort taux d'*ERα* (Andersen *et al.*, 1991; Jobling *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1997). En analysant la liaison d'un plus large panel de phtalates dans un modèle de plasmide rapporteur, une étude a montré qu'une majorité de ces composés a un effet agoniste sur *ERα* et antagoniste sur *ERβ* et *AR* (Takeuchi *et al.*, 2005). Toutefois, ceci n'est pas valable pour tous les phtalates testés, il existe, dans cette étude, une relative variabilité de réponse des différents phtalates qui est à prendre en considération.

Différentes études de gavages suggèrent l'implication des récepteurs aux hormones stéroïdes dans l'effet délétère des phtalates sur le testicule fœtal. Le gavage au DBP (en

concentrations croissantes de 250 à 700 mg/kg/jour) de rattes gestantes entre 10 et 19 jpc entraîne une diminution de l'expression du récepteur des androgènes, ainsi qu'une augmentation dose dépendante de celle de ER $\alpha$  chez le fœtus mâle (Kim *et al.*, 2010). Cette diminution de l'expression du récepteur des androgènes est retrouvée par Ryu et collaborateurs lors de gavages de rats prépubères au DBP (750 mg/kg/jour), quelque soit la durée du traitement. En revanche, les auteurs de cette étude obtiennent un effet inverse au niveau de ER $\alpha$  puisqu'ils décrivent une augmentation d'expression de ce récepteur, dépendante du temps d'exposition (Ryu *et al.*, 2008).

Chez la souris, les résultats de notre laboratoire montrent que l'effet des phtalates sur la diminution du nombre de cellules germinales et sur la production de testostérone est retrouvé dans les souris invalidées pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Ceci suggère que ces effets sur le testicule pendant la vie fœtale sont indépendants de ces récepteurs (Lehraiki *et al.*, 2009). Des études comparables ont été réalisées avec des souris invalidées pour le récepteur aux androgènes et aboutissent à la même conclusion de l'indépendance des effets des phtalates vis à vis du récepteur aux androgènes (Lehraiki *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la présence des récepteurs aux hormones stéroïdes dans le testicule fœtal humain, différentes études ont été réalisées. Au deuxième trimestre de la grossesse, deux isoformes de ER $\beta$ , ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 2, ont été mises en évidence (Brandenberger *et al.*, 1997; Saunders *et al.*, 2002) (Cf. III.2.3.) Le récepteur des androgènes  $\alpha$ , quant à lui, été mis en évidence dans les cellules péricubulaires et dans quelques cellules de Leydig à partir du premier trimestre de la grossesse (Berensztejn *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2005; Boukari *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données ne permet pas, à l'heure actuelle, de conclure quant à l'implication des récepteurs aux hormones stéroïdes dans les mécanismes d'action des phtalates.

Quelques études évoquent également l'implication des récepteurs aux glucocorticoïdes (NR3C1) et minéralocorticoïdes (NR3C2) dans les mécanismes d'action des phtalates. En effet, l'administration de concentrations croissantes 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). En parallèle, 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'ARNm et de la protéine du récepteur des minéralocorticoïdes dans les cellules de Leydig. Ces résultats sont corroborés par la diminution de l'expression de différents gènes cibles des minéralocorticoïdes (Martinez-Arguelles *et al.*, 2009).

### III.2.2.3. La voie des autres récepteurs nucléaires.

Outre les deux grandes catégories de récepteurs nucléaires que nous venons de décrire, d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires pourraient potentiellement être impliqués dans les effets des phtalates.

CAR (Constitutive Androstane Receptor) ou NR1I3 est un récepteur nucléaire qui fonctionne en hétérodimère avec RXR. Ce RN a la particularité d'être constitutivement actif indépendamment de son ligand. C'est en revanche la liaison de ce ligand (l'androstanoles ou l'androsténole) qui va induire le relargage des coactivateurs et la répression transcriptionnelle des gènes cibles (Forman *et al.*, 1998). De récents travaux 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 (Eveillard *et al.*, 2009; Dekeyser *et al.*, 2011). L'inactivation de CAR par shRNA supprime totalement l'expression de *cyp2b10* induite par le DEHP montrant aussi la nécessité du récepteur CAR dans ce mécanisme (Eveillard *et al.*, 2009). Dans le foie des souris invalidées pour *PPAR $\alpha$* , l'augmentation de l'expression de *cyp2b10* après traitement au DEHP montre que la voie CAR est activée (Ren *et al.*, 2010). Ceci suggère que les mécanismes d'action des phtalates peuvent être médiés par la modulation simultanée de différents récepteurs nucléaires.

PXR (Pregnane X Receptor) ou NR1I3 est un récepteur nucléaire appartenant au même groupe que CAR (NR famille 1 groupe I) qui fonctionne lui aussi en dimère avec RXR. PXR intervient dans l'induction d'enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes ainsi que dans la détoxification des xénobiotiques et de l'acide biliaire (Waxman, 1999; Xie *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 2003). Ce récepteur nucléaire est potentiellement impliqué dans les mécanismes d'action des phtalates. Une étude de transfection du PXR humain dans des cellules HepG2 (lignée humaine d'hépatocarcinome) a montré que le MEHP ainsi que le MBzP (Mono Benzyl Phtalate) pouvaient être des agonistes de PXR (Hurst and Waxman, 2004). Une autre étude apporte des résultats similaires sur des hépatocytes murins où

plusieurs gènes cibles de PXR voient leur expression stimulée par l'exposition à différents phtalates (Dekeyser *et al.*, 2011).

Enfin, quelques études mettent en avant une régulation de deux des membres de la famille des récepteurs nucléaires orphelins NR4A, c'est à dire NGFIB (Nerve Growth Factor IB) aussi connu sous l'appellation Nurr77 (NR4A1) et Nor1 (Neurone-derived Orphan Receptor, NR4A3). En effet, les différentes analyses d'expression de gènes à haut débit menées sur le rat et la souris ont montré une augmentation de l'expression des ARNm de *NR4A1* et *NR4A3* dans le testicule après exposition *in utero* à différents phtalates (Liu *et al.*, 2005; Gaido *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007). Des données similaires sont observables dans d'autres modèles. Ainsi, dans une lignée de cellules tumorales surrénaliennes (NCI-H295R) et dans des cellules tumorales de la granulosa humaine (KGN), l'exposition au MEHP induit une augmentation rapide du niveau d'ARNm des différents membres de la famille des NR4A (Noda *et al.*, 2007; Ohno *et al.*, 2009).

L'intégration de ces données dans leur ensemble, nous montre clairement, d'une part que différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires peuvent potentiellement participer aux mécanismes d'action de l'effet toxique des phtalates, et d'autre part, ces données montrent aussi la complexité de ces mécanismes. De ce fait, il semble hautement probable que les phtalates n'agissent pas nécessairement en activant un récepteur nucléaire unique mais déclenchent l'activation de plusieurs d'entre eux. La biodisponibilité des différents récepteurs nucléaires ainsi que des cofacteurs nécessaires à leur régulation est très certainement impliquée dans les mécanismes d'action des phtalates et varie probablement dans les différents modèles d'études.



---

# MATERIELS ET METHODES

---



## I. PRELEVEMENT DES TESTICULES FOETAUX 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. René Frydman. Le projet a été soumis et validé par le comité local d'éthique. Un consentement écrit de chaque patiente pour un prélèvement à but scientifique est requis pour chaque échantillon.

Les fœtus âgés de 8 à 13 semaines d'aménorrhée (soit 6 à 11 semaines post fécondation) 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. 48h 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 identifiées 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.

L'âge des fœtus est déterminé, par nos soins, en se basant sur la 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 majoritairement 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 d'aménorrhée.

Pour les fœtus âgés de plus de 9 semaines d'aménorrhée, 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 plus allongée. De même, par transparence on peut observer les cordons séminifères du testicule alors que l'ovaire présente un aspect homogène.

En dessous de 9 semaines d'aménorrhée, la gonade présente extérieurement un aspect indifférencié empêchant toute détermination morphologique. Nous avons donc mis au point une méthode de génotypage sur la discrimination du gène SRY (Forward : AGCAAGCAGCTGGGATCCA ; Reverse : GTGAAGCGACGTCTCATGGC ; Eurogentec S.A., Liège, Belgique). L'ADN génomique est d'abord extrait d'un fragment de muscle du fœtus, puis l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) du gène SRY est réalisée dans les conditions suivantes : une première phase de dénaturation de 2min à 94°C, puis 35 cycles d'amplification comprenant une phase de dénaturation de 30sec à 94°C, une hybridation de 30sec à 56°C et une phase de polymérisation d'1min à 72°C, et enfin une phase de polymérisation finale de 10min à 72°C. La présence ou l'absence de l'amplicon est ensuite visualisée par migration des produits de PCR sur un gel d'agarose (1%).

## II. CULTURE ORGANOTYPIQUE :

---

### *II.1. 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 0,04 mg/mL de gentamycine (Sigma-Aldrich). Ce milieu de culture est dépourvu de rouge de phénol (indicateur colorimétrique du pH) car ce composé peut présenter une activité oestrogénique susceptible d'interagir avec les différents perturbateurs utilisés dans cette étude.

- La LH humaine utilisée provient d'extraits d'hypophyse (Sigma-Aldrich) et est ajoutée au milieu de culture toutes les 24h à la concentration de 100 ng/mL.

- 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 4000, 40000 et 400000 fois dans le milieu de culture afin d'obtenir des concentrations finales de  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M et  $10^{-6}$ M.

- Le Chlorure de Cadmium (Sigma-Aldrich) est dilué dans l'eau stérile à 1M et congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis cette solution est elle-même diluée de manière à obtenir la concentration d'utilisation requise.

- Les cristaux d'acétate d'uranyle (Merck) sont dilués à 100mM dans du bicarbonate de sodium, cette préparation est homogénéisée puis filtrée et directement diluée dans du milieu de culture à la concentration finale désirée.

## *II.2. Méthode de culture :*

Le profil pathologique des échantillons humains étant inconnu, 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 sont coupés en morceaux dans du milieu de culture sous une loupe binoculaire, d'abord le long de l'axe longitudinal, puis selon un axe transversal. De cette manière, chaque fragment de testicule comprend une régionalisation complète du sillon central jusqu'à la zone corticale de la gonade et est représentatif de l'hétérogénéité du testicule. Les morceaux de testicule sont placés sur des inserts Millicell (Millipore, Billeria, USA) qui flottent à la surface de 320 $\mu\text{L}$  de milieu nutritif dans une plaque de culture 4 puits (Nunc). L'insert comporte une membrane poreuse (pores de 0,45 $\mu\text{m}$ ) sur laquelle sont placés les fragments de testicule ce qui permet à la fois une bonne oxygénation et un apport nutritif nominal des échantillons. Les plaques de culture sont placées dans un incubateur thermostaté à  $37^{\circ}\text{C}$  dont l'atmosphère est saturée en vapeur d'eau et contenant un mélange gazeux composé de 95% d'air et 5% de  $\text{CO}_2$ .

La culture dure 4 jours et les milieux sont renouvelés toutes les 24 heures et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  afin de doser ultérieurement la sécrétion de testostérone.

En raison de la rareté du matériel humain, une grande majorité des protocoles expérimentaux est réalisé non pas avec le testicule entier mais avec plusieurs fragments. Or le testicule fœtal humain est très hétérogène et il est très difficile d'obtenir des morceaux parfaitement identiques produisant la même sécrétion basale de testostérone. Nous avons donc choisi d'exprimer la sécrétion de testostérone en pourcentage d'un jour témoin (J0) au cours duquel les morceaux sont incubés avec du milieu de culture témoin. Puis au deuxième jour

(J1) de culture, le facteur à tester est ajouté dans l'un des deux puits. À la fin de la culture, les organes sont fixés pour l'analyse histologique, congelés à -80°C pour l'extraction de protéine, ou placés dans du tampon RLT (Qiagen) pour l'extraction d'ARN.

### III. TRI DE CELLULES :

---

La méthode de tri de cellules par FACS (Fluorescence Assay Cell Sorting) est basée sur la lecture optique d'un signal de fluorescence émis par ces cellules dans un cytomètre en flux. Les cellules en suspension dans un liquide vont passer sous forme de flux laminaire monocellulaire devant les lasers de lecture qui vont précisément quantifier le ou les niveaux de fluorescence de chaque cellule, représentatifs de différents critères biologiques. Le flux va ensuite être fragmenté en gouttelettes par un cristal piézoélectrique, chaque gouttelette contenant une cellule va être électriquement chargée en fonction des niveaux de fluorescence et des paramètres de tris sélectionnés par l'utilisateur. Des déflecteurs magnétiques vont ensuite dévier la trajectoire de cette gouttelette en fonction de la charge électrique et la diriger vers le tube de collection correspondant, permettant ainsi la séparation et la récupération précise de ces cellules.

La méthode de FACS présente l'avantage technique de pouvoir trier des populations cellulaires d'une pureté très élevée en comparaison à d'autres méthodes, tel que le MACS (Magnétique Assay Cell Sorting) puisque le caractère restrictif des paramètres de tri est manuellement déterminé par l'utilisateur. Cette méthode permet en outre de trier simultanément plusieurs populations cellulaires puisque les trieurs les plus récents sont à même de lire jusqu'à 18 signaux de fluorescence simultanément (Chattopadhyay *et al.*, 2008).

Les gonades sont mécaniquement et enzymatiquement dissociées dans un mélange de PBS supplémenté en collagénase (1%) et DNase (10%) à 37,5°C. Après dissociation, les cellules sont centrifugées 7min à 1200g et le surnageant est remplacé par une solution bloquante de PBS/BSA5% pendant 20min. Après centrifugation, les cellules testiculaires sont incubées dans l'anticorps primaire dirigé contre le marqueur de surface M2A (Abcam, 1/200) pendant 40min. Les cellules sont rincées puis centrifugées et incubées en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa488 (Invitrogen, 1/500) pendant 20min. Après un dernier rinçage, les cellules sont reprises dans 500µL de PBS/BSA2% puis filtrées sur un

filtre de diamètre 50µm qui permet d'éliminer toutes les cellules qui ne seraient pas individualisées à la suite de la dissociation et placées dans un tube de FACS.

Juste avant de trier les cellules, de l'iodure de propidium (IP, 2.5ng/mL; Sigma-Aldrich) est ajouté à la suspension cellulaire. L'IP va pénétrer dans les cellules dont la membrane a été perméabilisée ce qui permettra ultérieurement d'exclure les cellules mortes du tri.

Le tri des cellules germinales est réalisé sur un FACS-trieur BD-Influx™ (Beckton Dickinson). Une première fenêtre de sélection est tracée sur un profil SSC vs FSC (taille des cellules versus rapport nucléo-cytoplasmique) afin d'exclure les débris cellulaires. La population cellulaire ainsi sélectionnée est ensuite représentée sur un profil à deux voies, le marquage de l'IP en abscisse et le marquage M2A en ordonnée. Sur cette représentation, les deux fractions M2A(-)/IP(+) et M2A(+)/IP(+) représentant les cellules mortes sont exclues. Deux fenêtres de tri sont ensuite tracées respectivement sur les fractions M2A(-)/IP(-) et M2A(+)/IP(-) permettant la récupération des populations de cellules vivantes positives et négatives pour le marqueur M2A. Les cellules triées sont directement récupérées dans du tampon RLT pour l'extraction des ARNs et congelées à -20°C.

Avant chaque expérience, l'appareil est calibré avec un échantillon témoin dans lequel l'anticorps primaire anti-M2A est remplacé par l'isotype correspondant (IgG de souris). Cette étape essentielle permet de déterminer le seuil de fluorescence afin de discriminer le signal propre au marquage de celui de l'auto fluorescence des cellules.

#### IV. STRATEGIES D'ANALYSE :

---

##### *IV.1. Histologie :*

###### *IV.1.1 Préparation des échantillons.*

Trois heures avant l'arrêt de la culture, 1% de BrdU à 30µg/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'Hématoxyline Eosine est réalisée sur quelques coupes pour vérifier leur état. Les coupes sont montées sur des lames Superfrost traitées à l'APES (3-aminopropyltriéthoxylane) recouvertes d'albumine glycéinée 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 5 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.

#### *IV.1.2 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3%) pendant 10 min pour éviter toute réaction parasite ultérieure, puis les sites de liaison non spécifique de l'anticorps sont ensuite saturés dans du sérum bloquant (BSA 5%) pendant 30 min avant que les coupes soient mises à incuber en présence de l'anticorps primaire (2h à température ambiante ou une nuit à 4°C). Après rinçage, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante. Cet anticorps secondaire est couplé à la biotine. Pour révéler l'immunomarquage, les coupes sont incubées avec le complexe ABC (Complexe Avidine Biotine), l'avidine couplée à la peroxydase se fixe sur la biotine de l'anticorps secondaire amplifiant ainsi le signal. 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, puis brièvement placées dans la BSA (5%) 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 contrôle pour laquelle l'anticorps primaire est remplacé par un IgG isotype de la même espèce.

Dans le cas d'un marquage immunofluorescent, le protocole est similaire à ce qui est décrit ci-dessus, à ceci près que l'étape de blocage des peroxydases endogènes est omise car la révélation du marquage ne se base pas sur la visualisation d'un substrat des peroxydases. L'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome, après rinçage, les coupes sont directement montées dans du Vectashield (Vector Laboratory), un milieu de montage aqueux supplémenté en DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), un intercalant de l'ADN fluorescent permettant la visualisation des noyaux cellulaires.

#### IV.1.2.1. Comptage des cellules germinales.

Les cellules germinales sont parfois reconnaissables par leur morphologie, ce sont des cellules rondes plus grosses que les cellules de Sertoli, avec un cytoplasme et un noyau assez clair à la coloration à l'hématoxyline. Il est néanmoins difficile d'identifier avec certitude ces cellules sans marquage spécifique. Un marquage de l'AMH est donc réalisé pour colorer les cellules de Sertoli qui forment les cordons séminifères, ceci laisse apparaître les cellules germinales qui se retrouvent négativement marquées au sein de ces cordons. Ces dernières deviennent donc aisément identifiables pour une numération précise.

Le comptage des gonocytes est effectué selon la méthode précédemment validée (Olaso *et al.*, 1998), on réalise un marquage sur un certain nombre de coupes réparties sur toute la longueur du testicule à intervalles réguliers de manière à obtenir au moins 10 coupes. Toutes les cellules germinales, dont le noyau est apparent, sont comptées grâce au logiciel Histolab (Microvision) et à un analyseur d'image (microscope optique Olympus relié à un ordinateur par le biais d'une caméra analogique). Le nombre de cellules comptées représente le nombre brut de cellules par coupe, lequel est biaisé par la possibilité de compter un même gonocyte sur deux coupes (noyau de 10 microns dans une coupe de 5 microns d'épaisseur). Pour corriger ce biais, on applique la formule d'Abercrombie :  $NV = NB \cdot S / (S + D)$ . NV représente le véritable nombre de cellules germinales par coupe, NB le nombre brut compté, S l'épaisseur de la coupe et D le diamètre moyen des noyaux (qui est estimé sur au moins 100 noyaux pris sur 3 coupes au minimum). Ce nombre vrai est ensuite divisé par le nombre de

coupes comptées et rapporté au nombre de coupes totales du testicule ce qui donne une estimation du véritable nombre de cellules dans l'organe (Abercrombie, 1946).

#### IV.1.2.2. 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 sur 3 coupes différentes, puis le pourcentage de cellules positives pour le marquage (BrdU pour la prolifération et caspase3 clivée pour l'apoptose) est calculé pour estimer la prolifération ou l'apoptose.

### IV.2. Analyse d'expression de gène :

#### IV.2.1 Extraction d'ARN.

Deux cas sont à dissocier : les extractions d'ARNs à partir de la gonade entière ou à partir des différentes populations de cellules triées. Pour la gonade entière, les explants sont soumis aux ultrasons afin de désagréger les fragments d'organe et libérer les ARNs. Dans le cas de cellules triées, ces dernières sont simplement vortexées pour briser les membranes cellulaires. L'extraction des ARNs totaux est ensuite réalisée en utilisant les kits Rneasy mini et micro (Qiagen) pour l'organe entier ou les cellules triées respectivement. 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. Dans le cas des cellules triées, la concentration en ARNs se trouve sous le seuil de détection de l'appareil et il est donc impossible de quantifier ces 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 20µL final, alors que les ARNs issus de cellules triées sont rétrotranscrits au volume maximum du kit (10µL dans 20µL final).

#### IV.2.2 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* 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 25µL selon le protocole suivant :

- Amorces pour sonde SYBR :
  - SYBR green Master Mix (2X) : 12,5µL
  - Amorce Sens (10µM) : 1µL
  - Amorce Antisens (10µM) : 1µL
  - H<sub>2</sub>O RNase free : 1,5µL
  - ADNc (Dilution minimum 1/10) : 9µL
  
- Amorces pour sonde TaqMan :
  - TaqMan Gene Expression Master Mix (2X) : 12,5µL
  - Amorce (Sens et Antisens) : 1µL
  - H<sub>2</sub>O RNase free : 1,5µL
  - ADNc (Dilution minimum 1/10) : 9µL

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  $\Delta CT$ . La différence des  $\Delta CT$  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.2.3 Plaques Microfluidiques. :*

Dans cette étude, nous avons utilisé les plaques microfluidiques ou plaques TLDA (TaqMan Low Density Array) proposées par Applied Biosystems. Ces plaques sont un intermédiaire entre la qPCR standard et l'analyse globale d'expression de gènes par transcriptome. En effet, les plaques TLDA permettent l'analyse rapide de l'expression des ARNs de grandes familles de gènes, tout en requérant un temps et une quantité de matériel beaucoup plus faible que pour une analyse transcriptomique. Dans le cadre de nos travaux, nous avons choisi d'utiliser les plaques dédiées aux différents membres de la famille des récepteurs nucléaires humains.

Dans ces plaques de 384 puits d'un volume de 1µL sont pré-déposées les amorces TaqMan des 48 récepteurs nucléaires connus chez l'homme ainsi que 16 gènes de référence, le tout en trois réplicats pour deux échantillons. Un mix de chargement est préparé de la manière suivante :

- TaqMan Gene Expression Master Mix (2X) : 200µL
- H<sub>2</sub>O RNase free : 180µL
- ADNc (500ng final) : 20µL

Chaque plaque comporte quatre baies de chargement par échantillon pour 100µL de mix par baie, la plaque est ensuite centrifugée, scellée puis placée dans le thermocycleur. L'acquisition des résultats se fait à l'aide du thermocycleur 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) et l'analyse se fait selon le même principe que pour une qPCR standard.

### *IV.3. Analyses protéiques :*

#### *IV.3.1 Extraction et dosage de protéines :*

Les testicules conservés à -80°C, après culture organotypique ou prélèvement, sont décongelés sur glace en présence de tampon de lyse recommandé pour les protéines

phosphorylées (20mM Tris pH7,5 , 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% triton, 2,5mM sodium pyrophosphate, 1mM  $\beta$ -Glycerolphosphate, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Leupeptin, 1mM PMSF) à raison de 50 $\mu\text{L}$  par testicule fœtal humain. Une lyse par ultrasons est réalisée avec un sonicateur puis après 20min sur glace, les lysats sont centrifugés à 10000g, 20min à 4°C et le surnageant récupéré.

La quantité de protéine est dosée par la technique de Bradford dans des plaques 96 puits. Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexification provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu (Bradford, 1976). Une gamme est réalisée à partir de concentrations croissantes de BSA (15 à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 10 $\mu\text{L}$  d'échantillon (dilué au 1/10) ou de gamme sont additionnés de 250 $\mu\text{L}$  de réactif de Bradford (Biorad) dilué au 1/5. La quantité de protéine dans les puits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 595nm.

#### IV.3.2 Gel d'électrophorèse et Western Blot :

Les échantillons et le marqueur de poids moléculaire Rainbow (RPN800 Amersham) sont portés à ébullition pendant 5 min dans du tampon de chargement 1X (0.1mM DTT, 40mM Tris pH6,7 , 12,5% glycérol, 0,003% bleu bromophénol, 2% SDS) pour dénaturer les protéines.

Les protéines sont ensuite séparées selon leur poids moléculaire grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Les échantillons sont chargés dans un gel de concentration (125mM Tris pH 6,8 , 0,1% SDS, 5% acrylamide, 0,05% APS, 0,1% TEMED) qui précède un gel de séparation à 10% de polyacrylamide (375mM Tris pH 8,8 , 0,1% SDS, 10% acrylamide, 0,05% APS, 0,1% TEMED). La migration se fait dans du tampon d'électrophorèse (24mM Tris, 190mM glycine, 0,1% SDS).

Après migration, les protéines contenues dans le gel sont adsorbées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond, Amersham) par la technique de transfert électrophorétique (Western blot) en milieu liquide. La membrane est d'abord réhydratée dans du tampon de transfert (10% méthanol, 24mM Tris, 186mM glycine). Le gel est placé sur la membrane et monté entre 2 feuilles de papier Whatmann et des éponges, puis placé dans la cuve de transfert remplie de tampon. Un courant électrique de 100V pendant 1h est appliqué et permet le transfert des protéines depuis le gel sur la membrane.

#### IV.3.3 Immunodétection des protéines - Western Multiplex :

La révélation de western blot par multiplex présente premièrement l'avantage de pouvoir révéler simultanément la protéine d'intérêt ainsi que la protéine de référence dans deux longueurs d'onde différentes et ne nécessite donc pas de déshybrider la membrane. Deuxièmement, le signal de fluorescence est émis sur une longueur d'onde précise (déterminée par la longueur d'onde d'émission du fluorochrome), il est plus linéaire et donc plus précisément quantifiable qu'un signal ECL (Enhanced ChemiLuminescent) classique.

Les membranes sont d'abord placées dans une solution de blocage de TBS (Tris Buffer Saline, 20mM Tris, 136mM NaCl, pH 8) avec 0,1% de Tween-20 et 5% de lait pendant 1h afin de saturer les sites de fixation non spécifique de l'anticorps. Les membranes sont ensuite mises à incuber une nuit à 4°C dans un mélange contenant les deux anticorps primaires contre la protéine d'intérêt et la protéine de référence servant à contrôler le chargement des puits et à normaliser la quantité de la protéine d'intérêt entre les différents puits. Après trois rinçages de 7 min dans du TBS/0,1%Tween, les membranes sont incubées en présence d'un mélange des deux anticorps secondaires (anti-lapin couplé Cy5 et anti-souris couplé Cy3) pendant 1h à température ambiante. Les membranes sont rincées 3x 7min dans du TBS/0,1%Tween puis dans du TBS. La lecture de l'émission de fluorescence des membranes se fait dans un scanner Thyphoon (Amersham), tandis que le traitement des images ainsi que la quantification de fluorescence sont réalisés avec le logiciel Fluorstep (Molecular Dynamics).

#### IV.4. 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-<sup>3</sup>H] 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  $\beta$  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.

## V. STATISTIQUES :

---

Le logiciel Instat 3 a été utilisé pour réaliser les tests statistiques. En raison du faible nombre d'échantillons, il est impossible d'appliquer la loi normale et par conséquent de réaliser des tests paramétriques. Pour les comptages histologiques, le test apparié non paramétrique de Wilcoxon permettant la comparaison de deux moyennes a été choisi, en revanche, pour l'analyse des résultats de qPCR nous avons utilisé un test-t apparié, adapté aux petits échantillons. Pour les analyses de production de testostérone, nous avons privilégié un test de Kruskal-Wallis permettant de comparer l'évolution d'un même paramètre au cours du temps, entre deux séries d'échantillons.



---

# RESULTATS

---



## ARTICLE 1 :

---

### PHTHALATE IMPAIRS GERM CELL DEVELOPMENT IN THE HUMAN FETAL TESTIS *IN VITRO* WITHOUT CHANGE IN TESTOSTERONE PRODUCTION.

*Romain Lambrot\*, Vincent Muczynski\*, Charlotte Lécureuil, Gaëlle Angenard, Hervé Coffigny, Catherine Pairault, Delphine Moison, René Frydman, René Habert et Virginie Rouiller-Fabre*

Juste avant le commencement de ma thèse, une équipe écossaise a publié une étude expérimentale s'intéressant à l'effet d'un phtalate sur la fonction stéroïdogène du testicule fœtal humain au deuxième trimestre de la gestation (Hallmark *et al.*, 2007). En utilisant un modèle de culture *in vitro*, les auteurs de cet article sont arrivés à la conclusion que le DBP n'avait, au deuxième trimestre, aucun effet sur la fonction stéroïdogène. Néanmoins, cette étude ne s'était focalisée que sur la synthèse de testostérone et n'avait pas du tout abordé la fonction gamétogène. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'amorcer ce travail, portant sur l'impact des phtalates sur le développement du testicule fœtal humain et notamment sur les deux fonctions stéroïdogène et gamétogène, au premier trimestre de la grossesse. Nous avons jugé cette période du développement fœtal particulièrement pertinente car c'est pendant cette fenêtre de temps que s'amorce la mise en place de ces deux fonctions fondamentales. En effet, c'est au premier trimestre que se forment les cordons séminifères, au sein desquels se développent les cellules germinales fœtales. De même, c'est pendant ce premier trimestre de la grossesse que débute la synthèse de testostérone responsable, en grande partie, de la masculinisation du fœtus. De fait, toute perturbation du développement testiculaire pendant cette période critique peut avoir de graves répercussions sur la fertilité de l'individu adulte.

Dans ce travail, nous avons bénéficié de la collaboration établie avec le service de Gynécologie Obstétrique du Pr. Frydman à l'hôpital A. Béclère, grâce à laquelle nous récupérons les fœtus issus d'interruptions volontaires de grossesse entre la 7<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation. Les testicules fœtaux ont été prélevés par nos soins et mis en culture. Nous avons analysé, dans ce modèle de culture organotypique, l'effet du MEHP, le métabolite actif de l'un des phtalates les plus répandus, sur le développement des trois types cellulaires majeurs du testicule fœtal : les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

Au niveau des cellules de Leydig, nous avons mesuré, par dosage radio immunologique, la production de testostérone sécrétée dans le milieu de culture. Nous avons mis en évidence que, quelque soit la dose de MEHP utilisée, la production de testostérone reste inchangée pendant les 72h de culture. Ces résultats ont été corroborés par l'analyse de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse dont l'expression est inchangée même après traitement à la plus forte dose de MEHP ( $10^{-4}$ M). De même, l'agrégation des cellules de Leydig qui semble caractériser l'effet de l'exposition aux phtalates chez le rat n'a pas été retrouvée chez l'Homme. En ce qui concerne la fonction gamétogène, nous nous sommes d'abord intéressés aux cellules de Sertoli, supports des cellules germinales. Nos analyses histologiques ont montré que la prolifération et l'apoptose de ces cellules ne sont pas affectées par le traitement. En revanche, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de l'AMH, dont la production est caractéristique des cellules de Sertoli. Enfin nous avons analysé l'effet du MEHP sur le développement des cellules de la lignée germinale. Nous avons montré que le traitement au MEHP pendant 72h à la dose de  $10^{-4}$ M provoque une rapide diminution d'environ 40% du nombre de cellules germinales fœtales total par rapport au contrôle. Cette diminution est due à l'augmentation de l'apoptose de ces cellules, sans modification de leur capacité de prolifération.

Grâce à ces travaux, nous avons apporté la première démonstration expérimentale d'un effet délétère des phtalates sur le développement du testicule fœtal humain. En accord avec les résultats de Hallmark et collaborateurs au deuxième trimestre de la gestation, les phtalates ne semblent pas affecter la fonction stéroïdogène du premier trimestre. En revanche, nous avons démontré que deux des types cellulaires composants les cordons séminifères, sièges de la fonction gamétogène, se trouvaient altérés par l'exposition au MEHP. Nous pouvons donc envisager, dans le testicule fœtal humain, un découplage entre les effets des phtalates sur la stéroïdogénèse et la gamétogénèse jusqu'alors associés dans les études menées chez le rat. Ces effets sont donc susceptibles de faire intervenir des mécanismes différents.



## ARTICLE 2 :

---

THE HIGHEST ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO MONO-(2-ETHYL HEXYL) PHTHALATE IS SUFFICIENT TO INDUCE APOPTOSIS OF MALE FETAL GERM CELLS IN HUMAN.

*Vincent Muczynski, Jean-Pierre Cravedi, Abdelali Lehraiki, Christine Levacher, Delphine Moison, Charlotte Lecureuil, Sébastien Messiaen, Elisabeth Perdu, René Frydman, René Habert et Virginie Rouiller-Fabre*

Dans le premier article, nous avons démontré l'effet délétère du MEHP, le métabolite actif majeur du DEHP, sur le développement du testicule fœtal humain et plus précisément sur la lignée germinale fœtale (Lambrot *et al.*, 2009). Ces effets ont été observés pour une dose de  $10^{-4}$ M, ce qui correspond à une dose relativement élevée. Les études de mesure des taux de phtalates dans différents fluides biologiques ont rapporté des taux très variables entre les différents individus. Certaines études ont détecté des taux élevés de phtalates et dans le sang du cordon ombilical, les taux de MEHP peuvent atteindre  $10^{-5}$ M (Latini *et al.*, 2003). Il nous a donc paru fondamental d'évaluer les effets du MEHP sur le développement du testicule fœtal pour une dose à laquelle le fœtus humain peut être soumis *in utero*.

Dans ce travail nous avons donc analysé, dans notre modèle de culture organotypique, l'effet de  $10^{-5}$ M de MEHP sur le développement des cellules germinales fœtales. Nous avons démontré que cette dose entraîne, après 72h de culture, une augmentation marquée de l'apoptose de ces cellules germinales. De plus, la comparaison avec les résultats obtenus pour la dose de  $10^{-4}$ M nous montre que le MEHP exerce un effet dose dépendant sur l'apoptose des cellules germinales.

De part leur nature de composant des PVCs, les phtalates ont la capacité de s'adsorber sur les surfaces plastiques. Ce phénomène peut s'avérer particulièrement gênant dans le cas de nos études réalisées *in vitro*. En effets, les différents éléments qui composent notre modèle de culture sont constitués de plastiques (plaques de culture, inserts) et l'adsorption des phtalates sur ces surfaces pourrait fausser nos observations. Cette question fut soulevée à plusieurs reprises au cours de ma thèse. Nous avons donc, dans la deuxième partie de ce travail, analysé la distribution du MEHP dans notre modèle de culture organotypique de testicule fœtal humain.

En utilisant du MEHP marqué au  $^{14}$ C nous avons mesuré la concentration de MEHP dans le milieu de culture ainsi que dans la gonade fœtale après 24h d'incubation. Dans un premier temps, ceci nous a permis de mettre en évidence que, seule une faible proportion de

MEHP s'adsorbait sur les éléments plastiques de la culture et que la concentration intratesticulaire en MEHP était similaire à la concentration initiale que nous avons ajoutée au milieu de culture. Dans un deuxième temps, l'analyse par chromatographie des composés marqués au  $^{14}\text{C}$ , présents dans le milieu de culture au terme des 24h d'incubation, nous a permis de constater que le MEHP n'était pas métabolisé en composés secondaires par le testicule fœtal humain. Les effets que nous observons sont, par conséquent, bien imputables au MEHP et non pas à un de ses métabolites secondaires.

Enfin, il est évident que dans le cadre des études sur le modèle humain, l'approche *in vitro* est la seule qui soit envisageable et l'extrapolation des résultats obtenus expérimentalement à l'exposition de l'individu peut s'avérer délicate. Afin de renforcer la validité d'une telle extrapolation, nous avons voulu comparer dans le modèle murin, les approches *in utero* et *in vitro*, et comparer les effets sur les cellules germinales fœtales avec ceux observés après traitement en culture organotypique. Pour cela nous avons gavé au MEHP des souris NMRI gestantes à 13,5jpc afin de nous placer dans les conditions expérimentales similaires aux travaux *in vitro* de Lehraiki et collaborateurs menés au laboratoire (Lehraiki *et al.*, 2009). Les analyses histologiques réalisées à 14,5jpc ont mis en évidence une diminution similaire du nombre de cellules germinales fœtales entre l'exposition *in utero* et *in vitro*. Ces résultats sont corroborés par une augmentation également similaire du taux d'apoptose de ces cellules.



## ARTICLE 3 :

---

### MECHANISMS OF MEHP ON HUMAN FETAL GONAD: A NEW PATHWAY INVOLVING NUCLEAR RECEPTOR AND METABOLIC REGULATION.

*Vincent Muczynski, Charlotte Lecureuil, Sébastien Messiaen, Delphine Moison, Wassim Hodroj, Hinde Benjelloun, Jan Baijer, René Frydman, Gabriel Livera, René Habert et Virginie Rouiller-Fabre*

Dans la dernière partie de mon travail de thèse, nous nous sommes attachés à décrire les mécanismes d'action du MEHP sur le testicule fœtal humain. Quelles que soient les espèces, très peu de données sont disponibles dans la littérature quant à leurs mécanismes d'action. C'est probablement dans le foie que les mécanismes sont le mieux caractérisés. En effet, dans cet organe, l'utilisation de souris invalidées pour le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  a permis de mettre en évidence l'implication de ce récepteur dans les effets hépatocarcinogènes des phtalates (Ward *et al.*, 1998). L'utilisation de ces mêmes souris a également permis de montrer que, chez le mâle, PPAR $\alpha$  est impliqué dans une partie des effets délétères des phtalates sur le testicule adulte (Ward *et al.*, 1998). Toutefois, dans ce dernier cas, ces mécanismes font probablement aussi intervenir les autres isoformes de PPAR voir même d'autres récepteurs. Par ailleurs, quelques études de gavage *in utero* ont montré une modification de l'expression des ARNm de différents récepteurs nucléaires (RNs), notamment PPAR $\gamma$  et les membres la famille des NR4, induite par le DiBP ou le DEHP dans le testicule fœtal, aussi bien chez le rat que chez la souris (Gaido *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007; Boberg *et al.*, 2008). Il nous a, dès lors, semblés particulièrement intéressant de rechercher l'implication des différents membres de la superfamille des RNs dans les mécanismes d'action du MEHP sur le développement du testicule fœtal humain.

En utilisant une approche de plaques microfluidiques qui a permis d'analyser l'expression des 48 récepteurs nucléaires connus chez l'Homme, nous avons démontré que le traitement au MEHP ( $10^{-4}$ M) diminue la transcription de PPAR $\gamma$  et NR4A1 et augmente le taux d'ARNm de LXR $\alpha$  dans le testicule fœtal humain. Afin de faire le lien avec l'apoptose des cellules germinales que nous observons, nous avons mis au point une stratégie originale d'isolement des cellules germinales fœtales humaines par FACS en nous basant sur le critère de sélection du marqueur oncogénique M2A, exprimé par 90 à 95% de la population germinale au cours du premier trimestre de la grossesse (Pauls *et al.*, 2006). En utilisant cette méthode, nous avons analysé l'expression de ces RNs dans les fractions somatiques et

germinales. Nous avons montré ici que PPAR $\gamma$  ne semble exprimé que dans les cellules germinales ; toutefois, nous n'avons pas retrouvé l'effet du MEHP sur l'expression de ce récepteur. Nous avons également mis en évidence que l'expression de NR4A1 est réduite à la fois dans les cellules somatiques et les cellules germinales. Enfin, l'augmentation de l'expression de LXR $\alpha$  qui n'est augmentée que dans les cellules somatiques sans être modifiée dans les cellules germinales nous a paru particulièrement intéressante.

La régulation transcriptionnelle d'un récepteur n'étant pas nécessairement le reflet d'une régulation de son activité, nous avons analysé différents gènes cibles de LXR $\alpha$ . Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de SCD1 (Stearoyl Coenzyme-A Desaturase 1) et SREBP1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c) qui sont impliquées dans le processus de synthèse des acides gras, ainsi qu'à celle de HMGCoaRed (HydroxyMethylGlutaryl Coenzyme-A Reductase) et SqEp (Squalene Epoxydase) qui interviennent toutes deux dans la biosynthèse du cholestérol (Miyazaki *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2000; Horton *et al.*, 2002; Maxwell *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2006). Nous avons montré que l'expression des ARNm de ces quatre gènes est régulée positivement par le traitement au MEHP dans le testicule fœtal humain.

Que ce soit pour les effets observés sur l'apoptose des cellules germinales ou sur l'augmentation de l'expression de LXR $\alpha$  et de ces gènes cibles, nous nous sommes demandés si cet effet est spécifique du testicule fœtal humain. Nous avons donc étudié l'effet du MEHP sur l'ovaire fœtal humain dans le même modèle de culture organotypique. Nous avons montré qu'au niveau des RNs, seul LXR $\alpha$  voit son expression augmentée par le traitement au MEHP, alors que les expressions de PPAR $\gamma$  et NR4A1 restent inchangées. Par conséquent, nous avons analysé l'expression des mêmes gènes cibles de LXR $\alpha$  que dans le testicule fœtal humain. Ici encore nous avons montré que, similairement à nos observations dans le testicule, le MEHP induit une augmentation de l'expression de ces différents gènes cibles dans l'ovaire fœtal humain. En revanche, en ce qui concerne les cellules germinales ovariennes, celles-ci ne semblent pas affectées par le traitement au MEHP, que ce soit en terme de nombre de cellules ou d'apoptose.

Dans cette étude, nous avons montré que, chez l'Homme, l'exposition au MEHP de la gonade fœtale mâle et femelle entraîne probablement une augmentation de la synthèse des acides gras et du cholestérol, induite par l'activation de LXR $\alpha$ . Ce nouveau mécanisme d'action des phtalates, commun à la gonade mâle et femelle, est certainement à dissocier de celui de l'apoptose des cellules germinales classiquement décrit chez le mâle. Ainsi un nouvel

axe de recherche s'ouvre afin de comprendre les mécanismes d'action des phtalates spécifiquement sur les cellules germinales mâles de la gonade fœtale humaine.

---

# DISCUSSION

---



Les travaux de ma thèse ont eu pour but de caractériser, dans un modèle *in vitro*, les effets des phtalates sur le développement de la fonction de reproduction chez le fœtus humain et d'identifier les mécanismes d'action qui sont responsables de ces effets. Au cours de ce travail, nous avons démontré pour la première fois, un effet délétère des phtalates sur les cellules germinales du testicule fœtal humain, au premier trimestre de la grossesse. Cette période du développement fœtal est particulièrement importante dans le cadre des études sur l'altération du développement testiculaire. En effet, Welsh et collaborateurs ont mis en évidence chez le rat, une « fenêtre de masculinisation » critique pour le développement testiculaire et la masculinisation du fœtus (Welsh *et al.*, 2008). Par extrapolation, ces auteurs ont replacé cette fenêtre entre la 8<sup>ème</sup> et la 14<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, ce qui correspond très exactement à notre période d'étude. Nous avons également mis en évidence l'absence d'effets des phtalates sur la production de testostérone ainsi que sur l'expression des ARNm des enzymes de la stéroïdogenèse, alors que l'altération de la fonction stéroïdogene est l'effet principal décrit chez le rat (Mylchreest *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003; Mahood *et al.*, 2005). Ce résultat a soulevé l'hypothèse d'un découplage entre les effets des phtalates sur les cellules germinales et sur la production de stéroïdes, qui passeraient donc par des mécanismes différents. Par la suite, il nous a paru fondamental d'analyser les mécanismes impliqués dans les effets des phtalates sur le testicule fœtal humain. Nous nous sommes en premier lieu intéressés à l'effet observé sur les cellules germinales fœtales. Le testicule fœtal étant un organe complexe constitué de différents types cellulaires, l'analyse spécifique des cellules germinales a nécessité le développement et la mise au point d'une stratégie originale d'isolement des cellules germinales. Cette mise au point complexe a représenté une large partie de ce travail.

Ce travail a été possible grâce à la collaboration établie avec le service de gynécologie obstétrique de l'hôpital A. Béclère du Pr. René Frydman, grâce auquel nous avons pu récupérer les fœtus issus d'interruption volontaire de grossesse. Cette collaboration, qui a débuté en 2003, a permis dans un premier temps la mise en place du modèle de culture organotypique du testicule fœtal humain, étape nécessaire pour toutes les études réalisées ensuite sur les effets de régulateurs et/ou de perturbateurs potentiels des fonctions testiculaires (Lambrot *et al.*, 2006a; Lambrot *et al.*, 2006b; Lambrot *et al.*, 2007).

Le modèle d'étude des gonades fœtales est un modèle qu'il est difficile d'appréhender. Le matériel humain est en effet très difficile à obtenir et les prélèvements surviennent de manière sporadique et irrégulière, ce qui a rendu très difficile la planification des expériences nécessaires à l'évolution de ce projet de thèse. Si les études chez les rongeurs peuvent être réalisées à la fois *in utero* et *in vitro*, l'approche *in vitro* est évidemment la seule possible pour l'étude du fœtus humain. Nous avons utilisé pour ce travail le modèle de culture organotypique de testicules fœtaux humains mis au point au laboratoire. Cette méthode a initialement été mise au point sur le testicule fœtal de rat, puis adaptée aux gonades murines et humaines (Livera *et al.*, 2000; Lambrot *et al.*, 2006a; Lambrot *et al.*, 2006b; Livera *et al.*, 2006). Chez l'homme, ce modèle permet, *in vitro*, la mise en place et le maintien des cordons séminifères. De plus, la culture permet le maintien des cellules germinales pour les fœtus jeunes, même si une légère diminution est observée pour les fœtus plus âgés qui présentent néanmoins un nombre de cellules germinales tout à fait satisfaisant (Lambrot *et al.*, 2006b). Concernant la sécrétion de testostérone, celle-ci est maintenue en culture organotypique pour les fœtus les plus jeunes. Au delà de 7 semaines de gestation, la stimulation des cellules de Leydig avec de la LH est nécessaire au maintien de la production de testostérone (Lambrot *et al.*, 2006b). Ce modèle de culture organotypique présente donc l'avantage technique intéressant de pouvoir conserver l'architecture du testicule fœtal et de maintenir les différents types cellulaires ainsi que leurs interrelations qui sont fondamentales pour le développement de cet organe (Habert *et al.*, 2001). Dans de précédentes études du laboratoire, ce modèle particulier a été employé afin d'étudier l'effet de différents régulateurs physiologiques tel que l'acide rétinoïque, ainsi que l'impact de perturbateurs physiques comme les rayonnements ionisants, sur le développement du testicule fœtal humain (Lambrot *et al.*, 2006a; Lambrot *et al.*, 2007). Ces travaux successifs ont permis d'affiner cette méthode afin d'obtenir un modèle d'étude performant.

Notre modèle présente néanmoins des limites qu'il ne faut pas négliger. En effet, la durée de nos cultures peut-être un facteur limitant. Dans la majorité de nos expériences, les cultures sont réalisées sur une durée de 4 jours ce qui est un temps très court comparativement aux 9 mois que dure la grossesse. Nous avons réalisé, au cours d'expériences préliminaires, des cultures sur un temps plus long (15 jours). Dans ces conditions expérimentales, la stimulation par la LH permet le maintien de la production de testostérone, en revanche, le

nombre de cellules germinales décroît en quinze jours ce qui ne correspond plus à la physiologie du développement testiculaire.

## II. EFFETS DES PHTALATES ET MECANISMES D'ACTION

---

Au cours de cette étude, nous avons analysé l'effet des phtalates sur le développement des différents types cellulaires du testicule. Les phtalates sont considérés comme des composés reprotoxiques et les travaux chez le rat montrent une inhibition de la synthèse de testostérone après traitement à différents phtalates, ce qui laisse supposer que ces composés agissent comme des perturbateurs endocriniens. Ces derniers se définissent comme des agents exogènes, 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). Dans la première partie de ce travail, afin de caractériser l'effet des phtalates, nous avons été contraint d'utiliser des doses fortes ( $10^{-4}$ M) par rapport à ce qui a pu être mesuré dans les différents fluides biologiques. Nous avons démontré que le MEHP ne modifiait pas, ni la production de testostérone ni l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse du testicule fœtal humain, au bout de 72h de traitement. Ce résultat nous a véritablement surpris car l'ensemble des études sur le rat décrit la diminution du taux de testostérone comme principal effet des phtalates. Plusieurs hypothèses sont envisageables : il est possible qu'une exposition de 72h ne soit pas suffisamment longue, au regard de la durée de la gestation humaine, pour induire un effet négatif sur la production de testostérone. Toutefois, les expériences préliminaires que nous avons réalisées sur 15 jours de traitement n'ont également pas permis d'observer cette diminution. Il est aussi possible que la fenêtre d'exposition choisie ne soit pas la bonne. Toutefois, si on compare nos résultats aux travaux d'Hallmark et collaborateurs, on constate qu'au deuxième trimestre la production de testostérone n'est pas non plus modulée par l'exposition au MBP (Hallmark *et al.*, 2007). Par ailleurs, différents travaux menés chez la souris *in vivo* et *in vitro* ont montré que le taux de testostérone n'était pas nécessairement diminué (Gaido *et al.*, 2007; Lehraiki *et al.*, 2009). Ainsi la notion de différence de réponse inter espèce pourrait être l'explication des différences d'effets observées au niveau de la stéroïdogénèse. Ceci remet en question le rôle des phtalates en temps que perturbateurs

endocriniens. Si ils peuvent effectivement être considérés comme tel chez le rat, les phtalates semblent restreints à la définition de « composés à caractère reprotoxique » chez l'Homme.

Dans ce travail nous nous sommes également intéressés aux cellules de Sertoli et aux cellules germinales qui composent les cordons séminifères. En ce qui concerne les cellules de Sertoli, nous avons démontré que le MEHP n'affecte pas la prolifération et l'apoptose de ces cellules. En revanche, nous avons observé une diminution marquée de l'expression de l'ARNm de l'*AMH*, ce qui corrèle avec les données de la littérature. Toutefois, nous n'avons pas retrouvé cette diminution au niveau protéique. Ceci peut s'expliquer par la demi-vie de l'AMH, suffisamment longue pour que nous n'ayons pas observé d'effet après 3 jours de culture. Nous avons également analysé l'expression de différents gènes caractéristiques des cellules de Sertoli. *SOX9* a son activité transcriptionnelle réduite, ce qui est cohérent avec la diminution de l'AMH que nous avons observée puisque *SOX9* est décrit pour réguler l'expression de l'*AMH* en se fixant avec SF-1 à sa séquence promotrice (de Santa Barbara *et al.*, 1998). En revanche, les expériences préliminaires réalisées sur différents gènes codant pour des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales se sont révélées négatives. En effet, l'occludine, ainsi que l'intégrine- $\beta 1$  et la laminine- $\gamma 3$  ont leur expression inchangée après traitement au MEHP. Les cellules de Sertoli semblent donc affectées par le traitement aux phtalates, toutefois il est impossible d'affirmer que ces cellules soient la cible majoritaire des phtalates. Il serait donc intéressant d'approfondir l'analyse des marqueurs de ces cellules, par exemple en mesurant leur production de lactate.

En ce qui concerne les cellules germinales, nous avons mis en évidence un effet délétère des phtalates sur le nombre de cellules germinales fœtales mâles, qui se traduit par une augmentation de l'apoptose de ces cellules. Ces résultats ont été obtenus initialement pour des doses fortes, nous avons donc réduit les doses et montré qu'à des concentrations susceptibles d'être mesurées dans les fluides biologiques, le MEHP exerce toujours cet effet délétère. Dans la suite de ces travaux, nous avons délibérément choisi d'exposer à la dose de  $10^{-4}$ M afin de décrire les mécanismes d'action des phtalates à une dose où l'effet de ces composés est nettement marqué. Ces résultats sont en accord avec les études menées chez les rongeurs (rat et souris) qui montrent également une diminution du nombre de cellules germinales fœtales après traitement aux phtalates. Toutefois chez l'Homme, l'utilisation du modèle de culture organotypique ne nous permet pas de relier cette diminution du nombre de cellules germinales fœtales à une baisse de la production spermatique ou à une baisse de la

fertilité. Si on se réfère aux données de la littérature, plusieurs études menées chez le rat ont montré que l'exposition *in utero* entraînait une diminution du nombre de cellules germinales fœtales se traduisant par une diminution du nombre de spermatozoïdes et une réduction de la fertilité à l'âge adulte (Mylchreest *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003; Mahood *et al.*, 2005; Ferrara *et al.*, 2006). Toutefois, les travaux de Ferrara et collaborateurs ont montré que cette baisse du nombre de spermatozoïdes peut être compensée à l'âge adulte (Fisher *et al.*, 2003). Néanmoins, la réduction expérimentale du nombre de cellules germinales pendant la vie fœtale est décrite pour entraîner une diminution du nombre de spermatozoïdes chez l'adulte (Forand *et al.*, 2009). On peut donc raisonnablement extrapoler à l'espèce humaine et poser l'hypothèse qu'une exposition aux phtalates pendant la grossesse peut se traduire par une réduction de la fertilité à l'âge adulte. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la population des cellules germinales humaines est très hétérogène et qu'il est par conséquent difficile de savoir si une sous population particulière est touchée. Il est intéressant de noter que nous n'avons pas mis en évidence de gonocytes plurinucléés chez l'Homme, alors que ces cellules sont décrites à la fois chez le rat et chez la souris (Kleymenova *et al.*, 2005; Borch *et al.*, 2006; Ferrara *et al.*, 2006; Boekelheide *et al.*, 2009). Dans ces deux espèces, ces cellules n'apparaissent que pour des traitements en fin de vie fœtale. En effet, les travaux de Lehraiki et collaborateurs chez la souris ont démontré que le traitement *in vitro* au MEHP à 13,5 jpc n'entraîne pas l'apparition de ces cellules particulières. En revanche, lorsque les testicules sont prélevés à 15,5 et 18,5 jpc, le traitement au MEHP se traduit à chaque fois par l'apparition de ces cellules (Lehraiki *et al.*, 2009). Nos cultures étant réalisées à partir de testicules fœtaux du premier trimestre, ceci pourrait expliquer l'absence de ces cellules plurinucléés dans notre modèle.

Le fait que le MEHP semble affecter une des fonctions des cellules de Sertoli et exerce un effet délétère sur le développement des cellules germinales fœtales, nous a amené à nous poser une question fondamentale ; Les phtalates exercent-ils un effet délétère direct sur les cellules germinales, ou indirect impliquant d'autres types cellulaires et notamment les cellules de Sertoli ?

Nous avons montré que l'effet délétère du MEHP passe par l'augmentation de l'apoptose des cellules germinales, que nous avons mis en évidence par le marquage de la caspase 3 clivée, située au carrefour des voies d'apoptose intrinsèques et extrinsèques (Omezzine *et al.*, 2003). Toutefois, nous possédons peu de données quant aux mécanismes qui peuvent régir l'apoptose de ces cellules. Les quelques travaux préliminaires visant premièrement à discriminer une voie d'apoptose extrinsèque ou intrinsèque dans les cellules

germinales, ont montré que la caspase-9 (caspase activatrice de la voie intrinsèque) n'était pas impliqué dans ce mécanisme. Ceci suggère plutôt une potentielle implication de la voie extrinsèque, favorisant ainsi l'hypothèse d'un effet indirect des phtalates. Nous avons également analysé succinctement l'expression de certains gènes impliqués dans différents mécanismes d'apoptose et notamment la voie Fas/FasL et NF-kB incriminés dans les mécanismes d'action des phtalates sur le testicule de souris adulte (Richburg *et al.*, 2000; Rasoulpour and Boekelheide, 2005). Ces analyses se sont révélées négatives puisque FasL (exprimé par les cellules de Sertoli adultes) ne semble pas ou peu exprimé dans le testicule fœtal humain. Dans l'hypothèse d'un effet indirect, il nous a semblé important de nous intéresser à l'interaction entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. En effet, la perte de ces interactions associée à une altération des éléments constitutifs des ces jonctions a été mise en cause dans l'effet des phtalates (Li *et al.*, 1998; Kleymenova *et al.*, 2005). Nous avons donc analysé l'expression des ARNm de la cytokératine 18, l'occludine, ainsi que ceux de l'intégrine- $\beta$ 1 et de la laminine- $\gamma$ 3. Leur expression s'est révélée inchangée après traitement au MEHP. Ceci indique que la perte d'interaction entre cellules de Sertoli et cellules germinales n'est peut-être pas responsable de l'apoptose des cellules que nous avons observée. Toutefois, il serait instructif de réaliser une étude de marquage immunohistochimique de ces différents éléments pour déterminer si leur organisation structurale peut-être altérée par l'exposition aux phtalates. La détection de la caspase 8 clivée apporterait aussi une donnée importante quant à l'origine intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose des cellules germinales.

En ce qui concerne l'ovaire fœtal humain, il n'existe aucune étude décrivant l'effet des phtalates sur la lignée germinale fœtale femelle. Seules quelques études ont montré des effets sur les cellules somatiques. Les cellules de la granulosa, chez le rat comme chez la souris et l'humain, sont affectées *in vitro* par le traitement aux phtalates (Lovekamp and Davis, 2001; Gupta *et al.*, 2010). L'absence d'induction de l'apoptose dans les cellules germinales fœtales de l'ovaire humain, à des doses entraînant une apoptose très nettement marquée dans le testicule fœtal, représente donc une nouvelle donnée majeure.

Si l'utilisation d'un modèle de culture d'organe s'est avérée fondamentale afin de conserver les interrelations entre les différents types cellulaires pour l'étude de l'effet des phtalates sur le testicule fœtal humain, l'analyse d'une population bien précise se révèle beaucoup plus compliquée. Ceci est notamment vrai lorsqu'il s'agit de la population des cellules germinales, qui représente une très faible proportion des cellules du testicule fœtal

humain. Dès lors, toute analyse de transcription de gènes spécifiquement modulés dans cette population cellulaire sera résolument indétectable. Cette constatation nous a poussé à développer une stratégie d'étude alternative afin de pouvoir analyser spécifiquement les effets du MEHP sur les cellules germinales. Nous avons donc choisi de développer une méthode d'isolement des gonocytes après traitement en culture organotypique. La mise au point de ce protocole s'est avérée difficile et a représenté une grande part de mon travail de thèse.

Afin de pouvoir réaliser une analyse d'expression de gènes dans les populations triées, il est impératif de collecter ces cellules vivantes, puisque la fixation peut altérer la qualité des ARNm. En premier lieu il nous a fallu déterminer le marqueur le plus pertinent pour la sélection des cellules germinales. Il était impératif d'utiliser un marqueur membranaire ne nécessitant pas la perméabilisation des cellules, or, très peu sont décrits chez l'Homme et il n'existe, à l'heure actuelle, aucun marqueur décrit comme étant spécifique de l'intégralité de la population germinales. c-KIT, le récepteur membranaire du SCF était un candidat intéressant, toutefois, ce marqueur n'est exprimé au premier trimestre que par 80% de la totalité des cellules germinales (Pauls *et al.*, 2006). Etant donné que nous ne savons pas quelle sous population de cellules germinales peut-être affectée par les phtalates, il nous a semblé primordial de choisir le marqueur exprimé par la plus grande proportion de cellules. Nous avons donc éliminé c-KIT au profit de l'antigène M2A. Ce marqueur ontogénique est décrit pour recouvrir environ 90 à 95% des cellules germinales au cours du premier trimestre de la grossesse (Pauls *et al.*, 2006). L'utilisation de ce marqueur nous permet de minimiser au maximum le biais induit par la présence de plusieurs sous-populations de cellules germinales.

Pour le tri à proprement parler, les premiers essais ont été réalisés en utilisant la méthode de micromanipulation qui consiste à aspirer individuellement les cellules positives sous un microscope à fluorescence équipé d'une micro-pompe de précision. La fraction positive collectée par cette technique est extrêmement pure en raison de la sélection manuelle de chaque cellule, néanmoins c'est une méthode délicate, très longue et qui ne permet la récupération que d'une très faible quantité de matériel (environ 200 cellules pour une journée de micromanipulation), ce qui peut s'avérer fortement limitant pour l'analyse ultérieure de ces cellules. Cette méthode a donc été rapidement mise de côté au profit d'une stratégie de tri par FACS. Le FACS présente l'avantage d'une récupération beaucoup plus rapide d'une plus grande quantité de matériel, ainsi que la récupération simultanée des fractions positives et négatives, tout en conservant une excellente pureté de ces fractions. La sélection manuelle des fenêtres de tri permet en effet d'être très restrictif et donc d'éviter une potentielle contamination d'une fraction sur l'autre.

Grâce à cette méthode, nous avons mis en évidence que le traitement au MEHP modifie spécifiquement dans les cellules somatiques l'expression de plusieurs gènes. En effet, l'expression de LXR $\alpha$  ainsi que celle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (SCD1 et SREBP1c) et du cholestérol (HMGCoARed et SqEp) sont régulées positivement dans la fraction des cellules somatiques. Toutefois, nous n'avons pas, à l'heure actuelle, résolu la question d'un effet direct ou indirect des phtalates sur les cellules germinales fœtales humaines. Afin de véritablement répondre à cette question, la suite de ce travail va consister à développer un protocole de culture des cellules germinales isolées, afin de pouvoir traiter ces cellules seules et ainsi déterminer si oui ou non les phtalates sont à même d'exercer leur effet délétère directement sur la lignée germinale mâle fœtale. Cette mise au point va certainement s'avérer complexe car les cellules germinales sont particulièrement fragiles et nécessitent un environnement paracrine subtil pour se développer. L'utilisation de lignées cellulaires spécifiques pourrait également nous apporter des informations importantes.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également attachés à rechercher les mécanismes d'action impliqués dans l'altération de la mise en place des fonctions de reproduction chez le fœtus induite par le MEHP. Les phtalates sont connus pour pouvoir exercer leur action par le biais des récepteurs nucléaires. Dans un grand nombre d'études, les phtalates sont classés comme des proliférateurs de peroxyosome agissant via leurs récepteurs nucléaires appelés PPAR. Chez la souris notamment, la grande majorité de l'effet hépatocarcinogène des phtalates est imputée à PPAR $\alpha$  (Ward *et al.*, 1998). Au niveau testiculaire, différentes isoformes de ces récepteurs ont été mises en évidence. Chez le rat, il a été montré que l'expression des isoformes des PPARs varie en fonction de l'âge. Avant la naissance PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont fortement exprimés dans les cellules de Leydig fœtales. Chez l'homme, on ne dispose d'aucune donnée au stade fœtal mais chez l'adulte PPAR $\alpha$  est exprimé dans les cellules de Leydig et les spermatoocytes (Schultz *et al.*, 1999). Les souris invalidées pour PPAR $\alpha$  exposées in utero au DEHP présentent un retard de développement testiculaire moins important que les souris sauvages (Ward *et al.*, 1998; Gazouli *et al.*, 2002). Nous avons donc focalisé notre recherche sur les effets du MEHP sur l'expression des différents récepteurs nucléaires dans le testicule fœtal humain. Pour cela nous avons utilisé une approche par plaques microfluidiques qui est un intermédiaire entre la qPCR classique et l'analyse transcriptomique. Cette méthode permet une analyse de l'expression d'un grand nombre gènes d'une même famille, bien plus rapidement qu'en qPCR classique, tout en

nécessitant beaucoup moins de matériel et de mise au point que la réalisation d'un transcriptome.

Lorsque nous avons analysé l'implication des récepteurs nucléaires dans les mécanismes d'action de ces composés, nous avons mis en évidence une modification transcriptionnelle de PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$  et NR4A1 dans le testicule fœtal. Après traitement, l'expression de PPAR $\gamma$  est diminuée, néanmoins les analyses faites sur les fractions somatiques et germinales du testicule, montrent que PPAR $\gamma$  ne semble être exprimé que par les cellules germinales. Il est donc probable que la diminution d'expression observable sur testicule entier soit uniquement imputable à la réduction du nombre total de cellules germinales. Nous avons également mis en évidence une diminution de l'expression de NR4A1, à la fois dans les cellules somatiques et les cellules germinales. Enfin, le MEHP entraîne l'augmentation de l'expression de LXR $\alpha$  et ce, uniquement dans les cellules somatiques. LXR $\alpha$  est décrit pour être, entre autres, impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides gras (Peet *et al.*, 1998; Volle and Lobaccaro, 2007). Afin de vérifier l'implication fonctionnelle de ce récepteur, nous avons étudié les effets des phtalates sur différents gènes cibles de LXR $\alpha$ . SCD1 (Stearoyl Coenzyme-A Desaturase 1) et SREBP1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c) interviennent dans le processus de synthèse des acides gras et sont décrits pour être régulés par LXR $\alpha$  (Miyazaki *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2006). De même HMGCoaRed (HydroxyMethylGlutaryl Coenzyme-A Reductase) et SqEp (Squalene Epoxydase) sont deux gènes cibles de LXR $\alpha$  impliqués dans la voie de biosynthèse du cholestérol (Horton *et al.*, 2002; Maxwell *et al.*, 2003). Nous avons montré que ces quatre gènes cibles sont régulés positivement par l'exposition au MEHP dans le testicule fœtal humain. Ceci suggère que ces deux voies de synthèse des acides gras et du cholestérol sont régulées positivement par l'activation de LXR $\alpha$  après traitement au MEHP.

Ceci nous a amené à la question évidente de l'implication physiologique de cette régulation métabolique dans les effets des phtalates. Il semble difficile de pouvoir intégrer ces données à l'effet physiologique que nous avons décrit au début de cette étude, c'est à dire l'induction de l'apoptose des cellules germinales. En effet, dans l'ovaire fœtal humain, nous avons démontré que les cellules germinales fœtales n'étaient pas affectées par le traitement au MEHP. En revanche, nous avons retrouvé cette augmentation des ARNm de LXR $\alpha$  ainsi que des différents gènes cibles, suggérant que le MEHP influence ces deux voies métaboliques de manière similaire dans la gonade mâle et femelle. Il est donc probable que les phtalates induisent ici deux voies distinctes : une conduisant à l'apoptose des cellules germinales et

spécifique du testicule fœtal, alors que la deuxième impliquant la régulation du métabolisme des acides gras et du cholestérol, se retrouve à la fois dans le testicule et dans l'ovaire. Ceci suppose que ces deux voies impliquent des mécanismes d'action différents.

Au delà de son implication dans la régulation de l'homéostasie des acides gras et du cholestérol, il est maintenant admis que LXR $\alpha$  joue un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse. En effet, les souris adultes invalidées pour LXR $\alpha$  présentent une synthèse de testostérone réduite. Inversement, la stimulation par un agoniste de LXR $\alpha$  se traduit par une augmentation de la production de testostérone chez les animaux sauvages (Volle *et al.*, 2007). De plus, une étude récente réalisée sur le testicule fœtal de rat et de souris, vient juste de mettre en relation la modulation de la production de testostérone induite par l'exposition *in utero* au DBP et la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol contrôlée par les SREBPs (Johnson *et al.*, 2011). Cette équipe a montré que chez le rat une diminution de l'expression de SREBP2 ainsi que du taux de cholestérol intra-testiculaire se produit en parallèle de la diminution de la production de testostérone, alors qu'au contraire, l'expression de SREBP2 et la synthèse de cholestérol sont stimulées en concordance avec l'augmentation du taux de testostérone chez la souris (Johnson *et al.*, 2011). Ces données nous obligent à reconsidérer nos résultats concernant l'absence d'effet des phtalates sur la production de testostérone du testicule fœtal humain. Il est en effet possible qu'en raison de nos conditions expérimentales, nous n'ayons pas réussi à mettre en évidence d'effet sur la fonction stéroïdogène. Nos résultats sur la régulation positive de SREBP1c et des autres gènes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie des lipides et du cholestérol corrélent plutôt avec une stimulation de la production de testostérone. Nous pouvons également supposer que d'autres acteurs de la synthèse des stéroïdes, en aval du cholestérol, soient limitant, empêchant ainsi cette régulation positive de se traduire au niveau de la production de testostérone. Afin de vérifier nos hypothèses, il serait intéressant de doser les taux de cholestérol dans le testicule et l'ovaire fœtal pour déterminer si le traitement aux phtalates entraîne une accumulation dans ces organes. De même, il est nécessaire de vérifier si l'addition de cholestérol exogène dans le milieu de culture peut entraîner une augmentation de la production de testostérone fœtale.

Par ailleurs, les données que nous avons mises en évidence sur l'ovaire humain sont particulièrement intéressantes puisque c'est la première fois qu'une sensibilité de cet organe à l'exposition aux phtalates est démontrée pendant la vie fœtale.

### III. INTEGRATION DE NOS DONNEES DANS LE CONTEXTE DES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX.

---

L'impact des différents polluants de notre environnement sur le développement des fonctions de reproduction du fœtus est, à l'heure actuelle, devenu un problème de santé publique largement débattu.

En ce qui concerne les phtalates, nos travaux intégrés à l'ensemble des études réalisées chez le rat et la souris ont montré que les effets délétères sur la lignée germinale sont communs aux différentes espèces alors que les effets sur la fonction stéroïdogene varient énormément d'une espèce à l'autre. Il est intéressant de noter que la notion de sensibilité plus grande des cellules germinales à l'induction de l'apoptose par rapport aux autres types cellulaires du testicule est également retrouvée dans nos études sur les effets de cadmium et de l'uranium. En effet, pour ces deux métaux lourds, l'apoptose des cellules germinales est augmentée alors que, que ce soit dans le modèle humain ou murin, la production de testostérone n'est pas affectée. Cette sensibilité particulière des cellules germinales, notamment chez le mâle, est classiquement acquise dans la littérature. Par ailleurs, nos études sur les effets des rayonnements ionisants ont également montré, chez l'humain, une sensibilité plus importante des cellules germinales mâles par rapport aux cellules germinales femelles (Lambrot *et al.*, 2007; Guerquin *et al.*, 2009). De même, les cellules germinales fœtales humaines semblent beaucoup plus sensibles que les cellules germinales murines. En effet, que ce soit pour le cadmium ou l'uranium, les cellules germinales humaines montrent une sensibilité accrue à l'exposition aux métaux lourds. Ainsi chez le mâle, le traitement au cadmium (1 $\mu$ M) réduit le nombre de cellules germinales humaines en augmentant leur apoptose, alors que pour la même concentration aucun effet n'est observé au niveau des cellules germinales murines (Angenard *et al.*, 2010). Des résultats comparables sont retrouvés pour l'uranium (Angenard *et al.*, 2011).

Les travaux sur les différents modèles animaux ont une importance fondamentale dans l'étude de l'impact des polluants de l'environnement sur le développement de la gonade fœtale. En plus de la facilité d'accès à de grandes quantités de matériel nécessaires à un certain nombre d'analyses (notamment dans le cas d'analyses à haut débit tels que les analyses transcriptomiques ou protéomiques), ces modèles permettent également des approches qui sont absolument inenvisageables chez l'Homme. Toutefois, en raison des différences de sensibilité et de mécanismes, qui existent entre les différentes espèces,

l'approche expérimentale chez l'Homme reste à l'heure actuelle un modèle particulièrement pertinent.

En conclusion de ce travail de thèse, nous avons démontré que le testicule foetal humain est un organe particulièrement sensible à l'exposition à de multiples polluants présents dans notre environnement, en particulier en ce qui concerne la lignée germinale. La diversité et la nature de ces composés (plastifiants, métaux lourds) ainsi que la variété des sources d'exposition, soulèvent de grandes questions quant aux risques pour le développement du fœtus humain et sa fonction de reproduction.

#### IV. PERSPECTIVES

---

Pour aller plus loin dans la problématique de ma thèse, plusieurs axes sont à approfondir.

Afin de déterminer si l'altération du développement de la lignée germinale est la conséquence d'un effet direct ou indirect, il sera nécessaire de cultiver les cellules germinales isolées, de manière à pouvoir analyser l'effet direct des phtalates sur ces cellules. Toutefois, le matériel humain étant rare, il serait intéressant de pouvoir utiliser, en parallèle, une stratégie alternative. Il existe différentes lignées cellulaires qui pourraient être utilisées dans cette optique, en particulier la lignée TCAM qui dérive de cellules séminomales humaines (Mizuno *et al.*, 1993). Cette lignée présente la caractéristique d'exprimer un grand nombre de marqueurs communs aux cellules germinales, tels que NANOG, OCT3/4, c-KIT ou encore D2-40 et AP-2 $\gamma$  (Wermann *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant de caractériser l'effet du MEHP sur cette lignée cellulaire, de manière à déterminer si cette dernière peut être une alternative pertinente dans les études des mécanismes d'action du MEHP sur les cellules germinales qui nécessitent une grande quantité de matériel. De même, il existe des lignées humaines de cellules de Sertoli et de cellules de Leydig adultes qui pourraient être employées pour caractériser l'effet des phtalates sur ces types cellulaires spécifiques. En parallèle, nous avons projeté, grâce aux nouvelles méthodes d'analyse à haut débit sur petits échantillons, de réaliser une analyse transcriptomique comparative entre les cellules germinales et somatiques, avec et sans traitement. Cette analyse devrait nous permettre de définir les voies d'apoptose, intrinsèque ou extrinsèque, impliquées dans la diminution du nombre des cellules germinales.

Pour approfondir les travaux sur la régulation, par le traitement aux phtalates, de l'homéostasie des lipides et du cholestérol dans la gonade fœtale, nous devons tout d'abord démontrer la réalité fonctionnelle de cette régulation. Pour cela, la mesure des taux de cholestérol ainsi que de acides gras intra-testiculaires me semble essentielle. Afin de mettre en évidence le rôle des récepteurs nucléaires dans ces effets des phtalates et vérifier l'implication fonctionnelle de LXR $\alpha$ , nous réaliserons des cultures organotypiques soit en présence d'agoniste de LXR $\alpha$  soit en présence à la fois d'un antagoniste et de MEHP. Ceci devra impérativement être complété par la caractérisation, chez les souris invalidées pour LXR $\alpha$ , de l'effet des phtalates sur la gonade fœtale mâle et femelle, en terme d'apoptose des cellules germinales, comme de régulation métabolique.

Une interrelation possible de cette régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides gras avec l'apoptose des cellules germinales n'est pas à exclure. En effet, chez les souris adultes invalidée à la fois pour LXR $\alpha$  et  $\beta$ , l'apoptose des cellules germinales mâles est augmentée. Toutefois, le traitement des souris par un agoniste des LXRs n'altère pas l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose (Volle *et al.*, 2007). Nous mesurerons dans différentes cultures, en présence d'agoniste de LXR $\alpha$  ou en présence à la fois d'un antagoniste et de MEHP, le taux d'apoptose des cellules germinales mâles et femelles afin de déterminer si l'activation de LXR $\alpha$  et l'augmentation de la synthèse de cholestérol et/ou d'acides gras peut avoir une implication dans l'altération du développement de la lignée germinale fœtale mâle.



---

# BIBLIOGRAPHIE

---



---

**Abercrombie, M.** Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 1946;**94**, 239-247

**Abramovich, D. R., Baker, T. G. and Neal, P.** Effect of human chorionic gonadotrophin on testosterone secretion by the foetal human testis in organ culture. *J Endocrinol* 1974;**60**, 179-185

**Aho, M., Koivisto, A. M., Tammela, T. L. and Auvinen, A.** Is the incidence of hypospadias increasing? Analysis of Finnish hospital discharge data 1970-1994. *Environ Health Perspect* 2000;**108**, 463-465

**Akingbemi, B. T., Ge, R., Klinefelter, G. R., Zirkin, B. R. and Hardy, M. P.** Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**, 775-780

**Akingbemi, B. T., Youker, R. T., Sottas, C. M., Ge, R., Katz, E., Klinefelter, G. R., Zirkin, B. R. and Hardy, M. P.** Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod* 2001;**65**, 1252-1259

**Akre, O., Pettersson, A. and Richiardi, L.** Risk of contralateral testicular cancer among men with unilaterally undescended testis: a meta analysis. *Int J Cancer* 2009;**124**, 687-689

**Akre, O. and Richiardi, L.** Does a testicular dysgenesis syndrome exist? *Hum Reprod* 2009;**24**, 2053-2060

**Alam, M. S., Ohsako, S., Matsuwaki, T., Zhu, X. B., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Sone, H., Tohyama, C. and Kurohmaru, M.** Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 2010;**139**, 427-437

**Albrechtsen, R., Nielsen, M. H., Skakkebaek, N. E. and Wewer, U.** Carcinoma in situ of the testis. Some ultrastructural characteristics of germ cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 1982;**90**, 301-303

**Albro, P. W.** Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environ Health Perspect* 1986;**65**, 293-298

**Albro, P. W., Corbett, J. T., Schroeder, J. L., Jordan, S. and Matthews, H. B.** Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect* 1982;**45**, 19-25

**Almstrup, K., Nielsen, J. E., Mlynarska, O., Jansen, M. T., Jorgensen, A., Skakkebaek, N. E. and Rajpert-De Meyts, E.** Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br J Cancer* 2010;**103**, 1269-1276

**Anand-Ivell, R., Ivell, R., Driscoll, D. and Manson, J.** Insulin-like factor 3 levels in amniotic fluid of human male fetuses. *Hum Reprod* 2008;**23**, 1180-1186

**Andersen, J., Thorpe, S. M., Rose, C., Christensen, I., Rasmussen, B. B. and Poulsen, H. S.** Estrogen receptor in primary breast cancer estimated in paraffin-embedded tissue. A study of its usefulness compared to dextran-coated charcoal assay. *Acta Oncol* 1991;**30**, 685-690

**Anderson, R. A., Cambray, N., Hartley, P. S. and McNeilly, A. S.** 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* 2002;**123**, 779-788

**Anderson, R. A., Fulton, N., Cowan, G., Coutts, S. and Saunders, P. T.** Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol* 2007;**7**, 136

**Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Livera, G. and Rouiller-Fabre, V.** In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells. *Reprod Toxicol* 2011

**Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Pairault, C., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V. and Livera, G.** Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis. *Environ Health Perspect* 2010;**118**, 331-337

**Arango, N. A., Lovell-Badge, R. and Behringer, R. R.** Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 1999;**99**, 409-419

**Astill, B. D.** Metabolism of DEHP: effects of prefeeding and dose variation, and comparative studies in rodents and the cynomolgus monkey (CMA studies). *Drug Metab Rev* 1989;**21**, 35-53

**Atkin, N. B. and Baker, M. C.** Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet* 1982;**2**, 1349

**Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. and Jouannet, P.** Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;**332**, 281-285

**Auharek, S. A., de Franca, L. R., McKinnell, C., Jobling, M. S., Scott, H. M. and Sharpe, R. M.** Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 2010;**151**, 2868-2875

## B

---

**Bailey, D., Baumal, R., Law, J., Sheldon, K., Kannampuzha, P., Stratis, M., Kahn, H. and Marks, A.** Production of a monoclonal antibody specific for seminomas and dysgerminomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;**83**, 5291-5295

**Baker, M. L. and Hutson, J. M.** Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**76**, 245-247

**Baker, P., Monteiro, A., O'Shaughnessy, P. J. and Fowler, P. A.** Development of cell numbers in human fetal testis during the second trimester. *14th European Testis Workshop* 2006, Bad Aibling, Germany

**Balboni, G. C., Barni, T., Gloria, L., Forti, G. and Vannelli, G. B.** Alfa-inhibin and transferrin in human fetal testis. *Ital J Anat Embryol* 1995;**100 Suppl 1**, 519-524

**Barber, E. D., Fox, J. A. and Giordano, C. J.** Hydrolysis, absorption and metabolism of di(2-ethylhexyl) terephthalate in the rat. *Xenobiotica* 1994;**24**, 441-450

**Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K. C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E. R., Fraccaro, M. et al.** A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994;**7**, 497-501

**Barlow, N. J., Phillips, S. L., Wallace, D. G., Sar, M., Gaido, K. W. and Foster, P. M.** Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2003;**73**, 431-441

**Barthold, J. S. and Gonzalez, R.** The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchiopexy. *J Urol* 2003;**170**, 2396-2401

**Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Ulisse, S., Rucci, N., Jannini, E. A., Della Rocca, C., Manicone, A., Carani, C., Spera, G. et al.** Expression of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B, and PDGF receptor-alpha and -beta during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**, 2310-2319

**Baskin, L. S.** Hypospadias and urethral development. *J Urol* 2000;**163**, 951-956

**Baxter, J. D., Webb, P., Grover, G. and Scanlan, T. S.** Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends Endocrinol Metab* 2004;**15**, 154-157

**Bay, K., Asklund, C., Skakkebaek, N. E. and Andersson, A. M.** Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;**20**, 77-90

**Bay, K., Cohen, A. S., Jorgensen, F. S., Jorgensen, C., Lind, A. M., Skakkebaek, N. E. and Andersson, A. M.** Insulin-like factor 3 levels in second-trimester amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**, 4048-4051

**Becker, K., Seiwert, M., Angerer, J., Heger, W., Koch, H. M., Nagorka, R., Roskamp, E., Schluter, C., Seifert, B. and Ullrich, D.** DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Environ Health* 2004;**207**, 409-417

**Bendel-Stenzel, M., Anderson, R., Heasman, J. and Wylie, C.** The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 1998;**9**, 393-400

**Bendsen, E., Byskov, A. G., Laursen, S. B., Larsen, H. P., Andersen, C. Y. and Westergaard, L. G.** Number of germ cells and somatic cells in human fetal testes during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod* 2003;**18**, 13-18

**Bendsen, E., Laursen, S., Olesen, C., Westergaard, L., Andersen, C. and Byskov, A.** Effect of 4-octylphenol on germ cell number in cultured human fetal gonads. *Hum Reprod* 2001;**16**, 236-243

**Berensztein, E. B., Sciara, M. I., Rivarola, M. A. and Belgorosky, A.** 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* 2002;**87**, 5113-5118

**Berger, J. P., Akiyama, T. E. and Meinke, P. T.** PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005;**26**, 244-251

**Beysen, D., Vandesompele, J., Messiaen, L., De Paepe, A. and De Baere, E.** The human FOXL2 mutation database. *Hum Mutat* 2004;**24**, 189-193

**Biason-Lauber, A.** Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;**24**, 163-186

**Biason-Lauber, A., Konrad, D., Meyer, M., DeBeaufort, C. and Schoenle, E. J.** Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am J Hum Genet* 2009;**84**, 658-663

**Bility, M. T., Thompson, J. T., McKee, R. H., David, R. M., Butala, J. H., Vanden Heuvel, J. P. and Peters, J. M.** Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 2004;**82**, 170-182

**Bloomgarden, Z. T., Futterweit, W. and Poretsky, L.** Use of insulin-sensitizing agents in patients with polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract* 2001;**7**, 279-286

**Boas, M., Frederiksen, H., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N. E., Hegedus, L., Hilsted, L., Juul, A. and Main, K. M.** Childhood exposure to phthalates: associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth. *Environ Health Perspect* 2010;**118**, 1458-1464

**Boberg, J., Metzдорff, S., Wortziger, R., Axelstad, M., Brokken, L., Vinggaard, A. M., Dalgaard, M. and Nellemann, C.** Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 2008;**250**, 75-81

**Boekelheide, K., Kleymenova, E., Liu, K., Swanson, C. and Gaido, K. W.** 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* 2009;**72**, 629-638

**Bookout, A. L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R. T., Evans, R. M. and Mangelsdorf, D. J.** Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 2006;**126**, 789-799

**Borch, J., Dalgaard, M. and Ladefoged, O.** Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA--apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol* 2005;**19**, 517-525

**Borch, J., Ladefoged, O., Hass, U. and Vinggaard, A. M.** 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* 2004;**18**, 53-61

**Borch, J., Metzdorff, S. B., Vinggaard, A. M., Brokken, L. and Dalgaard, M.** Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 2006;**223**, 144-155

**Bornehag, C. G., Lundgren, B., Weschler, C. J., Sigsgaard, T., Hagerhed-Engman, L. and Sundell, J.** Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics. *Environ Health Perspect* 2005;**113**, 1399-1404

**Boukari, K., Ciampi, M. L., Guiochon-Mantel, A., Young, J., Lombes, M. and Meduri, G.** Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action. *Hum Reprod* 2007;**22**, 1885-1892

**Boukari, K., Meduri, G., Brailly-Tabard, S., Guibourdenche, J., Ciampi, M. L., Massin, N., Martinerie, L., Picard, J. Y., Rey, R., Lombes, M. et al.** Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**, 1818-1825

**Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J. et al.** Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006;**312**, 596-600

**Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**, 248-254

**Brandenberger, A. W., Tee, M. K., Lee, J. Y., Chao, V. and Jaffe, R. B.** Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**, 3509-3512

**Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G. and Kerjaschki, D.** Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997;**151**, 1141-1152

**Brennan, J. and Capel, B.** One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004;**5**, 509-521

**Bridges, C. B.** Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity. *Genetics* 1916;**1**, 1-52

**Buehr, M., Gu, S. and McLaren, A.** Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 1993;**117**, 273-281

## C

---

**Calafat, A. M. and McKee, R. H.** Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate] as a case study. *Environ Health Perspect* 2006;**114**, 1783-1789

**Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E.** Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;**305**, 609-613

**Castedo, S. M., de Jong, B., Oosterhuis, J. W., Seruca, R., Buist, J. and Koops, H. S.** Cytogenetic study of a combined germ cell tumor of the testis. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;**35**, 159-165

**Castrillon, D. H., Quade, B. J., Wang, T. Y., Quigley, C. and Crum, C. P.** The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**, 9585-9590

**Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R. and Welch, W. J.** The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J* 1985;**4**, 3131-3135

**Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A.** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;**113**, 643-655

**Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P. and Baulieu, E. E.** Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990;**265**, 20686-20691

**Chan, H., Bartos, D. P. and Owen-Schaub, L. B.** Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* 1999;**19**, 2098-2108

**Chao, M. V.** The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 1994;**25**, 1373-1385

**Chattopadhyay, P. K., Hogerkorp, C. M. and Roederer, M.** A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology* 2008;**125**, 441-449

**Chauvigne, F., Menuet, A., Lesne, L., Chagnon, M. C., Chevrier, C., Regnier, J. F., Angerer, J. and Jegou, B.** 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* 2009;**117**, 515-521

**Chemes, H. E., Rey, R. A., Nistal, M., Regadera, J., Musse, M., Gonzalez-Peramato, P. and Serrano, A.** Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**, 4408-4412

**Chen, T. M., Kuo, P. L., Hsu, C. H., Tsai, S. J., Chen, M. J., Lin, C. W. and Sun, H. S.** Microsatellite in the 3' untranslated region of human fibroblast growth factor 9 (FGF9) gene exhibits pleiotropic effect on modulating FGF9 protein expression. *Hum Mutat* 2007;**28**, 98

**Christiansen, S., Boberg, J., Axelstad, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A. M., Metzdorff, S. B. and Hass, U.** Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol* 2010;**30**, 313-321

**Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. C. and Ntambi, J. M.** Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol* 2006;**26**, 6786-6798

**Clausen, P. A., Hansen, V., Gunnarsen, L., Afshari, A. and Wolkoff, P.** 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* 2004;**38**, 2531-2537

**Clements, J. A., Reyes, F. I., Winter, J. S. and Faiman, C.** Studies on human sexual development. III. Fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentrations of LH, CG, and FSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;**42**, 9-19

**Clermont, Y. and Perey, B.** Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 1957;**100**, 241-267

**Cobellis, L., Latini, G., De Felice, C., Razzi, S., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P. and Petraglia, F.** High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2003;**18**, 1512-1515

**Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. et al.** Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* 2002;**39**, 916-921

**Codesal, J., Regadera, J., Nistal, M., Regadera-Sejas, J. and Paniagua, R.** Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *J Anat* 1990;**172**, 103-114

**Colon, I., Caro, D., Bourdony, C. J. and Rosario, O.** Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000;**108**, 895-900

**Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B. and Ornitz, D. M.** Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 2001;**104**, 875-889

**Cooke, J. E., Godin, I., Ffrench-Constant, C., Heasman, J. and Wylie, C. C.** Culture and manipulation of primordial germ cells. *Methods Enzymol* 1993;**225**, 37-58

**Cortes, D.** Histological versus stereological methods applied at spermatogonia during normal human development. *Scand J Urol Nephrol* 1990;**24**, 11-15

**Cortes, D., Muller, J. and Skakkebaek, N. E.** Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl* 1987;**10**, 589-596

**Corton, J. C. and Lapinskas, P. J.** Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci* 2005;**83**, 4-17

**Culty, M.** Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009;**87**, 1-26

**Culty, M., Thuillier, R., Li, W., Wang, Y., Martinez-Arguelles, D. B., Benjamin, C. G., Triantafilou, K. M., Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V.** 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* 2008;**78**, 1018-1028

## D

---

**Damstra, T.** Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002;**40**, 457-465

**David, R. M., Moore, M. R., Cifone, M. A., Finney, D. C. and Guest, D.** Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol Sci* 1999;**50**, 195-205

**Davis, B. J., Maronpot, R. R. and Heindel, J. J.** Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;**128**, 216-223

**de Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., Boizet, B. and Berta, P.** Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-mullerian hormone receptor. *J Biol Chem* 1998;**273**, 29654-29660

**Dekeyser, J. G., Laurenzana, E. M., Peterson, E. C., Chen, T. and Omiecinski, C. J.** Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor. *Toxicol Sci* 2011

**Dieckmann, K. P. and Skakkebaek, N. E.** Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J Cancer* 1999;**83**, 815-822

**Duplus, E., Benelli, C., Reis, A. F., Fouque, F., Velho, G. and Forest, C.** Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human adipose tissue: induction by rosiglitazone and genetic analyses of the adipocyte-specific region of the promoter in type 2 diabetes. *Biochimie* 2003;**85**, 1257-1264

## *E*

---

**Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C. A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D. E. and Berger, J.** Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**224**, 431-437

**Ema, M. and Miyawaki, E.** Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod Toxicol* 2001;**15**, 261-267

**Escriva, H., Langlois, M. C., Mendonca, R. L., Pierce, R. and Laudet, V.** Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci* 1998;**839**, 143-146

**Eveillard, A., Mselli-Lakhal, L., Mogha, A., Lasserre, F., Polizzi, A., Pascussi, J. M., Guillou, H., Martin, P. G. and Pineau, T.** Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol* 2009;**77**, 1735-1746

**Evtouchenko, L., Studer, L., Spenger, C., Dreher, E. and Seiler, R. W.** A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. *Cell Transplant* 1996;**5**, 453-464

**Ezeh, U. I., Turek, P. J., Reijo, R. A. and Clark, A. T.** Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005;**104**, 2255-2265

## *F*

---

**Fabjan, E., Hulzebos, E., Mennes, W. and Piersma, A. H.** A category approach for reproductive effects of phthalates. *Crit Rev Toxicol* 2006;**36**, 695-726

**Facemire, C. F., Gross, T. S. and Guillette, L. J., Jr.** Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect* 1995;**103 Suppl 4**, 79-86

**Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Metivier, R., Tudor, C., Anghel, S. I., Grosdidier, A., Lathion, C., Engelborghs, Y. et al.** The endocrine disruptor monoethylhexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 2007;**282**, 19152-19166

**Ferlin, A., Simonato, M., Bartoloni, L., Rizzo, G., Bettella, A., Dottorini, T., Dallapiccola, B. and Foresta, C.** The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**, 4273-4279

**Ferrara, D., Hallmark, N., Scott, H., Brown, R., McKinnell, C., Mahood, I. K. and Sharpe, R. M.** Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006;**147**, 5352-5362

**Fisher, J. S., Macpherson, S., Marchetti, N. and Sharpe, R. M.** Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003;**18**, 1383-1394

**Forand, A., Messiaen, S., Habert, R. and Bernardino-Sgherri, J.** Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospermia at sexual maturity. *Reproduction* 2009;**137**, 487-495

**Ford, C. E., Jones, K. W., Polani, P. E., De Almeida, J. C. and Briggs, J. H.** A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959;**1**, 711-713

**Forman, B. M., Tzamelis, I., Choi, H. S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R. M. and Moore, D. D.** Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* 1998;**395**, 612-615

**Foster, P. M.** Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 2006;**29**, 140-147; discussion 181-145

**Foster, P. M., Mylchreest, E., Gaido, K. W. and Sar, M.** Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update* 2001;**7**, 231-235

**Fowler, P. A., Abramovich, D. R., Haites, N. E., Cash, P., Groome, N. P., Al-Qahtani, A., Murray, T. J. and Lea, R. G.** Human fetal testis Leydig cell disruption by exposure to the pesticide dieldrin at low concentrations. *Hum Reprod* 2007;**22**, 2919-2927

**Fowler, P. A., Bhattacharya, S., Gromoll, J., Monteiro, A. and O'Shaughnessy, P. J.** Maternal smoking and developmental changes in luteinizing hormone (LH) and the LH receptor in the fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**, 4688-4695

**Fowler, P. A., Evans, L. W., Groome, N. P., Templeton, A. and Knight, P. G.** A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. *Hum Reprod* 1998;**13**, 3530-3536

**Francavilla, S., Cordeschi, G., Properzi, G., Concordia, N., Cappa, F. and Pozzi, V.** Ultrastructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990;**22**, 389-400

**Franke, F. E., Pauls, K., Rey, R., Marks, A., Bergmann, M. and Steger, K.** Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol (Berl)* 2004;**209**, 169-177

**Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E. and Andersson, A. M.** Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007;**51**, 899-911

**Fromme, H., Lahrz, T., Piloty, M., Gebhart, H., Oddoy, A. and Ruden, H.** Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany). *Indoor Air* 2004;**14**, 188-195

**Fujimoto, T., Miyayama, Y. and Fuyuta, M.** The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec* 1977;**188**, 315-330

**Fukami, M., Wada, Y., Miyabayashi, K., Nishino, I., Hasegawa, T., Nordenskjold, A., Camerino, G., Kretz, C., Buj-Bello, A., Laporte, J. et al.** CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat Genet* 2006;**38**, 1369-1371

**Fukuda, T., Hedinger, C. and Groscurth, P.** Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tissue Res* 1975;**161**, 55-70

## G

---

**Gaido, K. W., Hensley, J. B., Liu, D., Wallace, D. G., Borghoff, S., Johnson, K. J., Hall, S. J. and Boekelheide, K.** Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007;**97**, 491-503

**Gaskell, T. L., Esnal, A., Robinson, L. L., Anderson, R. A. and Saunders, P. T.** Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 2004;**71**, 2012-2021

**Gaskell, T. L., Robinson, L. L., Groome, N. P., Anderson, R. A. and Saunders, P. T.** Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**, 424-432

**Gazouli, M., Yao, Z. X., Boujrad, N., Corton, J. C., Culty, M. and Papadopoulos, V.** Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology* 2002;**143**, 2571-2583

**George, F. and Wilson, J.** Sex determination and differentiation. *The physiology of reproduction* 1994, Knobil, E. et Neill, J. New-York, Raven Press. 1: 3-28.

**George, F. W., Carr, B. R., Noble, J. F. and Wilson, J. D.** 5 alpha-reduced androgens in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;**64**, 628-630

**Giguere, V.** Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999;**20**, 689-725

**Gill, W. B., Schumacher, G. F., Bibbo, M., Straus, F. H., 2nd and Schoenberg, H. W.** Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J Urol* 1979;**122**, 36-39

**Giusti, R. M., Iwamoto, K. and Hatch, E. E.** Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med* 1995;**122**, 778-788

**Gjerstorff, M. F., Kock, K., Nielsen, O. and Ditzel, H. J.** MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod* 2007;**22**, 953-960

**Goll, V., Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., Nicod, L., Jaeck, D. and Richert, L.** Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;**160**, 21-32

**Goodwin, B., Gauthier, K. C., Umetani, M., Watson, M. A., Lochansky, M. I., Collins, J. L., Leitersdorf, E., Mangelsdorf, D. J., Klierer, S. A. and Repa, J. J.** Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**, 223-228

**Grande, S. W., Andrade, A. J., Talsness, C. E., Grote, K., Golombiewski, A., Sterner-Kock, A. and Chahoud, I.** A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology* 2007;**229**, 114-122

**Gray, L. E., Jr., Laskey, J. and Ostby, J.** Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 2006;**93**, 189-195

**Gray, T. J. and Beamand, J. A.** Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem Toxicol* 1984;**22**, 123-131

**Grinspon, R. P. and Rey, R. A.** Anti-mullerian hormone and sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Horm Res Paediatr* 2010;**73**, 81-92

**Griswold, S. L. and Behringer, R. R.** Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev* 2009;**3**, 1-15

**Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A. and Laudet, V.** Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**, 950-964

**Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R.** 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* 1990;**346**, 245-250

**Guerquin, M. J., Duquenne, C., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Lambrot, R., Bakalska, M., Frydman, R., Habert, R. and Livera, G.** Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. *Hum Reprod* 2009;**24**, 670-678

**Guerquin, M. J., Duquenne, C., Lahaye, J. B., Tourpin, S., Habert, R. and Livera, G.** New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Dev Biol* 2010;**346**, 320-330

**Guillette, L. J., Jr., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F. and Woodward, A. R.** Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 1994;**102**, 680-688

**Guillette, L. J., Jr. and Guillette, E. A.** Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? *Toxicol Ind Health* 1996;**12**, 537-550

**Gulisano, M., Pacini, S., Punzi, T., Morucci, G., Quagliata, S., Delfino, G., Sarchielli, E., Marini, M. and Vannelli, G. B.** Cadmium modulates proliferation and differentiation of human neuroblasts. *J Neurosci Res* 2009;**87**, 228-237

**Gupta, R. K., Singh, J. M., Leslie, T. C., Meachum, S., Flaws, J. A. and Yao, H. H.** Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;**242**, 224-230

## H

---

**Habert, R., Lejeune, H. and Saez, J. M.** Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;**179**, 47-74

**Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J. et al.** Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2002;**8**, 473-479

**Hallmark, N., Walker, M., McKinnell, C., Mahood, I. K., Scott, H., Bayne, R., Coutts, S., Anderson, R. A., Greig, I., Morris, K. et al.** Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat: comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect* 2007;**115**, 390-396

**Hanley, N. A., Ball, S. G., Clement-Jones, M., Hagan, D. M., Strachan, T., Lindsay, S., Robson, S., Ostrer, H., Parker, K. L. and Wilson, D. I.** Expression of steroidogenic factor

1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 1999;**87**, 175-180

**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. et al.** SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000;**91**, 403-407

**Harkonen, K., Huhtaniemi, I., Makinen, J., Hubler, D., Irjala, K., Koskenvuo, M., Oettel, M., Raitakari, O., Saad, F. and Pollanen, P.** The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men. *Int J Androl* 2003;**26**, 187-194

**Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. G. and Sumpter, J. P.** The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 1997;**105**, 802-811

**Hase, T., Yoshimura, R., Mitsuhashi, M., Segawa, Y., Kawahito, Y., Wada, S., Nakatani, T. and Sano, H.** Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology* 2002;**60**, 542-547

**Hasmall, S. C., James, N. H., Macdonald, N., West, D., Chevalier, S., Cosulich, S. C. and Roberts, R. A.** Suppression of apoptosis and induction of DNA synthesis in vitro by the phthalate plasticizers monoethylhexylphthalate (MEHP) and diisononylphthalate (DINP): a comparison of rat and human hepatocytes in vitro. *Arch Toxicol* 1999;**73**, 451-456

**Hauser, R., Duty, S., Godfrey-Bailey, L. and Calafat, A. M.** Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect* 2004;**112**, 751-753

**Heindel, J. J. and Powell, C. J.** Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;**115**, 116-123

**Helal, M. A., Mehmet, H., Thomas, N. S., Cox, P. M., Ralph, D. J., Bajoria, R. and Chatterjee, R.** Ontogeny of human fetal testicular apoptosis during first, second, and third trimesters of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**, 1189-1193

**Herbst, A. L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D. C.** Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 1971;**284**, 878-881

**Hering, R., Frade-Martinez, R., Bajanowski, T., Poets, C. F., Tschentscher, F. and Riess, O.** Genetic investigation of the TSPYL1 gene in sudden infant death syndrome. *Genet Med* 2006;**8**, 55-58

**Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. and Angerer, J.** Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2007;**210**, 623-634

**Hilscher, B. and Engemann, A.** Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during human prespermatogenesis. *Andrologia* 1992;**24**, 7-10

**Hilscher, W. and Hilscher, B.** Kinetics of the male gametogenesis. *Andrologia* 1976;**8**, 105-116

**Hinton, R. H., Mitchell, F. E., Mann, A., Chescoe, D., Price, S. C., Nunn, A., Grasso, P. and Bridges, J. W.** Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid. *Environ Health Perspect* 1986;**70**, 195-210

**Hoei-Hansen, C. E., Almstrup, K., Nielsen, J. E., Brask Sonne, S., Graem, N., Skakkebaek, N. E., Leffers, H. and Rajpert-De Meyts, E.** Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology* 2005;**47**, 48-56

**Hogberg, J., Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Remberger, M., Calafat, A. M., Filipsson, A. F., Jansson, B., Johansson, N., Appelgren, M. et al.** Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect* 2008;**116**, 334-339

**Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;**109**, 1125-1131

**Howdeshell, K. L., Rider, C. V., Wilson, V. S. and Gray, L. E., Jr.** Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res* 2008a;**108**, 168-176

**Howdeshell, K. L., Wilson, V. S., Furr, J., Lambright, C. R., Rider, C. V., Blystone, C. R., Hotchkiss, A. K. and Gray, L. E., Jr.** A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci* 2008b;**105**, 153-165

**Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A. N. and Bartley, J.** Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 1999;**87**, 349-353

**Huang, P., Chandra, V. and Rastinejad, F.** Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 2010;**72**, 247-272

**Huang, P. C., Kuo, P. L., Chou, Y. Y., Lin, S. J. and Lee, C. C.** Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 2009;**35**, 14-20

**Huang, P. C., Kuo, P. L., Guo, Y. L., Liao, P. C. and Lee, C. C.** Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod* 2007;**22**, 2715-2722

**Huhtaniemi, I. T., Korenbrot, C. C. and Jaffe, R. B.** HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;**44**, 963-967

**Hurst, C. H. and Waxman, D. J.** Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 2003;**74**, 297-308

**Hurst, C. H. and Waxman, D. J.** Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;**199**, 266-274

## I

---

**Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., MacDonald, E. and Aitken, J.** Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996;**312**, 467-471

**Ivell, R. and Bathgate, R. A.** Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod* 2002;**67**, 699-705

**Ivell, R. and Hartung, S.** The molecular basis of cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**, 175-181

## J

---

**Jacobs, P. A. and Strong, J. A.** A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;**183**, 302-303

**Jacobson-Dickman, E. and Lee, M. M.** The influence of endocrine disruptors on pubertal timing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;**16**, 25-30

**James, N. H., Soames, A. R. and Roberts, R. A.** Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB). *Arch Toxicol* 1998;**72**, 784-790

**Jirasek, J. E.** Genital ducts and external genitalia: development and anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1971;**7**, 131-139

**Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G. and Sumpter, J. P.** A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;**103**, 582-587

**Johnson, K. J., Hensley, J. B., Kelso, M. D., Wallace, D. G. and Gaido, K. W.** 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* 2007;**77**, 978-989

**Johnson, K. J., McDowell, E. N., Viereck, M. P. and Xia, J. Q.** Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci* 2011

**Johnson, L., Zane, R. S., Petty, C. S. and Neaves, W. B.** Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol Reprod* 1984;**31**, 785-795

**Jordan, B. K., Mohammed, M., Ching, S. T., Delot, E., Chen, X. N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P. N., Elejalde, B. R. and Vilain, E.** Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001;**68**, 1102-1109

**Jorgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Graem, N., Muller, J., Giwercman, A. and Skakkebaek, N. E.** Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 1995;**72**, 223-231

**Josso, N.** [Action of testosterone on the Wolffian duct of rat fetus in organ culture]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1970;**59**, 37-49

**Josso, N., Lamarre, I., Picard, J. Y., Berta, P., Davies, N., Morichon, N., Peschanski, M. and Jeny, R.** Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Hum Dev* 1993;**33**, 91-99

**Josso, N., Picard, J. Y., Rey, R. and di Clemente, N.** Testicular anti-Mullerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006;**3**, 347-358

**Jost, A. and Magre, S.** Sexual differentiation. *Reproduction in Mammals and Man* 1993, Thibault, C., Levasseur, M. et Hunter, R. H. F. Paris, Ellipses: 197-226.

## K

---

**Karl, J. and Capel, B.** Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 1998;**203**, 323-333

**Kasibhatla, S., Genestier, L. and Green, D. R.** Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1999;**274**, 987-992

**Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Shiroishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K. and Higashinakagawa, T.** Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 1998;**393**, 688-692

**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. et al.** 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* 1996;**104 Suppl 4**, 715-740

**Kerr, C. L., Hill, C. M., Blumenthal, P. D. and Gearhart, J. D.** Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. *Stem Cells* 2008;**26**, 412-421

**Kim, T. S., Jung, K. K., Kim, S. S., Kang, I. H., Baek, J. H., Nam, H. S., Hong, S. K., Lee, B. M., Hong, J. T., Oh, K. W. et al.** Effects of in utero exposure to DI(n-Butyl) phthalate on development of male reproductive tracts in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 2010;**73**, 1544-1559

**Kim, Y. and Capel, B.** Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. *Dev Dyn* 2006;**235**, 2292-2300

**Klymenova, E., Swanson, C., Boekelheide, K. and Gaido, K. W.** 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* 2005;**73**, 482-490

**Klip, H., Verloop, J., van Gool, J. D., Koster, M. E., Burger, C. W. and van Leeuwen, F. E.** Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 2002;**359**, 1102-1107

**Kluwe, W. M., Haseman, J. K., Douglas, J. F. and Huff, J. E.** The carcinogenicity of dietary di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *J Toxicol Environ Health* 1982;**10**, 797-815

**Koch, H. M., Bolt, H. M. and Angerer, J.** Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2004;**78**, 123-130

**Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R., Eckstein, R., Weisbach, V. and Angerer, J.** Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol* 2005;**79**, 689-693

**Koch, H. M., Preuss, R. and Angerer, J.** Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* 2006;**29**, 155-165; discussion 181-155

**Koch, H. M., Rossbach, B., Drexler, H. and Angerer, J.** Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res* 2003;**93**, 177-185

**Koike, E., Inoue, K., Yanagisawa, R. and Takano, H.** Di-(2-ethylhexyl) phthalate affects immune cells from atopic prone mice in vitro. *Toxicology* 2009;**259**, 54-60

**Koo, H. J. and Lee, B. M.** Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J Toxicol Environ Health A* 2004;**67**, 1901-1914

**Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R.** Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991;**351**, 117-121

**Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. and Lovell-Badge, R.** Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990;**348**, 450-452

**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.** Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet* 1995;**9**, 160-164

**Kuhl, A. J., Ross, S. M. and Gaido, K. W.** CCAAT/enhancer binding protein beta, but not steroidogenic factor-1, modulates the phthalate-induced dysregulation of rat fetal testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 2007a;**148**, 5851-5864

**Kuhl, A. J., Ross, S. M. and Gaido, K. W.** Using a comparative in vivo DNase I footprinting technique to analyze changes in protein-DNA interactions following phthalate exposure. *J Biochem Mol Toxicol* 2007b;**21**, 312-322

**Kurata, Y., Kidachi, F., Yokoyama, M., Toyota, N., Tsuchitani, M. and Katoh, M.** Subchronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol Sci* 1998;**42**, 49-56

## L

---

**Lague, E. and Tremblay, J. J.** Antagonistic effects of testosterone and the endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate on INSL3 transcription in Leydig cells. *Endocrinology* 2008;**149**, 4688-4694

**Lake, B. G., Gangolli, S. D., Grasso, P. and Lloyd, A. G.** Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;**32**, 355-367

**Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Donnadiou, A. C., Frydman, R., Habert, R. and Rouiller-Fabre, V.** Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006a;**91**, 2696-2703

**Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Lecureuil, C., Frydman, R., Habert, R. and Rouiller-Fabre, V.** High radiosensitivity of germ cells in human male fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**, 2632-2639

**Lambrot, R., Livera, G., Coffigny, H., Pairault, C., Frydman, R., Habert, R. and Rouiller-Fabre, V.** A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 2006b;**88**, 1831-1835

**Lambrot, R., Muczynski, V., Lecureuil, C., Angenard, G., Coffigny, H., Pairault, C., Moison, D., Frydman, R., Habert, R. and Rouiller-Fabre, V.** Phthalates impair germ cell

development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 2009;**117**, 32-37

**Lapinskas, P. J., Brown, S., Leesnitzer, L. M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R. C. and Corton, J. C.** Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 2005;**207**, 149-163

**Larsen, S. T. and Nielsen, G. D.** Structure-activity relationship of immunostimulatory effects of phthalates. *BMC Immunol* 2008;**9**, 61

**Lasfer, M., Vadrot, N., Aoudjehane, L., Conti, F., Bringuier, A. F., Feldmann, G. and Reyl-Desmars, F.** Cadmium induces mitochondria-dependent apoptosis of normal human hepatocytes. *Cell Biol Toxicol* 2008;**24**, 55-62

**Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F. and Mazzeo, P.** In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003;**111**, 1783-1785

**Laudet, V.** Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 1997;**19**, 207-226

**Le Bouffant, R., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Frydman, R., Habert, R. and Livera, G.** Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Hum Reprod* 2010;**25**, 2579-2590

**Lee, J., Richburg, J. H., Shipp, E. B., Meistrich, M. L. and Boekelheide, K.** The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 1999;**140**, 852-858

**Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C. and Boekelheide, K.** The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997;**138**, 2081-2088

**Lee, M. M., Donahoe, P. K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G. B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R. A., Schoenfeld, D. and MacLaughlin, D. T.** Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;**81**, 571-576

**Lehmann, K. P., Phillips, S., Sar, M., Foster, P. M. and Gaido, K. W.** Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2004;**81**, 60-68

**Lehraiki, A., Racine, C., Krust, A., Habert, R. and Levacher, C.** Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 2009;**111**, 372-382

**Leroyer, S. N., Tordjman, J., Chauvet, G., Quette, J., Chapron, C., Forest, C. and Antoine, B.** Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation. *J Biol Chem* 2006;**281**, 13141-13149

**Li, H. and Kim, K. H.** Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod* 2003;**69**, 1964-1972

**Li, L. H., Jester, W. F., Jr. and Orth, J. M.** Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;**153**, 258-265

**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. and Hardy, M. P.** Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**, 7218-7222

**Lin, L. and Achermann, J. C.** Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2008;**2**, 200-209

**Lin, Y. C., Yao, P. L. and Richburg, J. H.** FasL gene-deficient mice display a limited disruption in spermatogenesis and inhibition of mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced germ cell apoptosis. *Toxicol Sci* 2010a;**114**, 335-345

**Lin, Y. M., Tsai, C. C., Chung, C. L., Chen, P. R., Sun, H. S., Tsai, S. J. and Huang, B. M.** Fibroblast growth factor 9 stimulates steroidogenesis in postnatal Leydig cells. *Int J Androl* 2010b;**33**, 545-553

**Liu, K., Lehmann, K. P., Sar, M., Young, S. S. and Gaido, K. W.** Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod* 2005;**73**, 180-192

**Livera, G., Delbes, G., Pairault, C., Rouiller-Fabre, V. and Habert, R.** Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 2006;**324**, 507-521

**Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Durand, P. and Habert, R.** Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod* 2000;**62**, 1303-1314

**Lomenick, J. P., Calafat, A. M., Melguizo Castro, M. S., Mier, R., Stenger, P., Foster, M. B. and Wintergerst, K. A.** Phthalate exposure and precocious puberty in females. *J Pediatr* 2010;**156**, 221-225

**Lovekamp, T. N. and Davis, B. J.** Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;**172**, 217-224

**Lovekamp-Swan, T. and Davis, B. J.** Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 2003;**111**, 139-145

**Lovell-Badge, R.** Testis determination: soft talk and kinky sex. *Curr Opin Genet Dev* 1992;**2**, 596-601

**Lovell-Badge, R.** Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1993;**339**, 159-164

**Lu, B. and Bishop, C. E.** 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* 2003;**69**, 161-168

**Luo, X., Ikeda, Y. and Parker, K. L.** A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994;**77**, 481-490

## M

---

**Ma, M., Kondo, T., Ban, S., Umemura, T., Kurahashi, N., Takeda, M. and Kishi, R.** Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci* 2006;**93**, 164-171

**Mahood, I. K., Hallmark, N., McKinnell, C., Walker, M., Fisher, J. S. and Sharpe, R. M.** Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 2005;**146**, 613-623

**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. et al.** Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006;**114**, 270-276

**Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z. U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M. et al.** SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet* 2008;**82**, 39-47

**Maranghi, F., Lorenzetti, S., Tassinari, R., Moracci, G., Tassinari, V., Marcoccia, D., Di Virgilio, A., Eusepi, A., Romeo, A., Magrelli, A. et al.** In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects liver morphology and metabolism in post-natal CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2010;**29**, 427-432

**Marks, A., Sutherland, D. R., Bailey, D., Iglesias, J., Law, J., Lei, M., Yeager, H., Banerjee, D. and Baumal, R.** Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999;**80**, 569-578

**Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A. and Moulis, J. M.** Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 2006;**88**, 1807-1814

**Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R. and Capel, B.** Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 1997;**7**, 958-968

**Martinez-Arguelles, D. B., Culty, M., Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V.** In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. *Endocrinology* 2009;**150**, 5575-5585

**Matthiessen, P. and Sumpter, J. P.** Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. *EXS* 1998;**86**, 319-335

**Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E. and Breslow, J. L.** Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res* 2003;**44**, 2109-2119

**Maymon, B. B., Paz, G., Yogev, L., Hauser, R., Schreiber, L., Botchan, A. and Yavetz, H.** [Immunohistochemical identification of testicular germ cells--preliminary report]. *Harefuah* 2000;**139**, 179-182, 247

**McCabe, E. R. B.** Adrenal hypoplasias and aplasias. 2001, 8th edn. New York: McGraw-Hill

**McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M. and Oliver, M.** Urinary uranium concentrations in an enlarged Gulf War veteran cohort. *Health Phys* 2001;**80**, 270-273

**McKee, R. H.** Phthalate exposure and early thelarche. *Environ Health Perspect* 2004;**112**, A541-543

**McKenna, N. J. and O'Malley, B. W.** Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**949**, 3-5

**McKinnell, C., Mitchell, R. T., Walker, M., Morris, K., Kelnar, C. J., Wallace, W. H. and Sharpe, R. M.** Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod* 2009;**24**, 2244-2254

**McKinnell, C., Sharpe, R. M., Mahood, K., Hallmark, N., Scott, H., Ivell, R., Staub, C., Jegou, B., Haag, F., Koch-Nolte, F. et al.** 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* 2005;**146**, 4536-4544

**Meacham, L. R., Winn, K. J., Culler, F. L. and Parks, J. S.** Double vagina, cardiac, pulmonary, and other genital malformations with 46,XY karyotype. *Am J Med Genet* 1991;**41**, 478-481

**Meeker, J. D., Calafat, A. M. and Hauser, R.** Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ Health Perspect* 2007;**115**, 1029-1034

**Mifsud, A., Sim, C. K., Boettger-Tong, H., Moreira, S., Lamb, D. J., Lipshultz, L. I. and Yong, E. L.** Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil Steril* 2001;**75**, 275-281

**Milatiner, D., Halle, D., Huerta, M., Margalioth, E. J., Cohen, Y., Ben-Chetrit, A., Gal, M., Mimoni, T. and Eldar-Geva, T.** Associations between androgen receptor CAG repeat length and sperm morphology. *Hum Reprod* 2004;**19**, 1426-1430

**Mitchell, F. E., Price, S. C., Hinton, R. H., Grasso, P. and Bridges, J. W.** Time and dose-response study of the effects on rats of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;**81**, 371-392

**Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I. and Aizawa, S.** Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 1997;**124**, 1653-1664

**Miyazaki, M., Kim, Y. C., Gray-Keller, M. P., Attie, A. D. and Ntambi, J. M.** The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 2000;**275**, 30132-30138

**Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S. and Kitazawa, S.** [Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2)]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1993;**84**, 1211-1218

**Mollgard, K., Jespersen, A., Lutterodt, M. C., Yding Andersen, C., Hoyer, P. E. and Byskov, A. G.** Human primordial germ cells migrate along nerve fibers and Schwann cells from the dorsal hind gut mesentery to the gonadal ridge. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**, 621-631

**Molsberry, R. L., Carr, B. R., Mendelson, C. R. and Simpson, E. R.** Human chorionic gonadotropin binding to human fetal testes as a function of gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;**55**, 791-794

**Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Sudbeck, P. and Poulat, F.** Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev* 2000;**91**, 323-325

**Mosselman, S., Looijenga, L. H., Gillis, A. J., van Rooijen, M. A., Kraft, H. J., van Zoelen, E. J. and Oosterhuis, J. W.** Aberrant platelet-derived growth factor alpha-receptor transcript as a diagnostic marker for early human germ cell tumors of the adult testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**, 2884-2888

**Muller, D., Davidoff, M. S., Bargheer, O., Paust, H. J., Pusch, W., Koeva, Y., Jezek, D., Holstein, A. F. and Middendorff, R.** The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells. *Histochem Cell Biol* 2006;**126**, 199-211

**Muroya, K., Okuyama, T., Goishi, K., Ogiso, Y., Fukuda, S., Kameyama, J., Sato, H., Suzuki, Y., Terasaki, H., Gomyo, H. et al.** Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**, 3094-3100

**Mylchreest, E., Wallace, D. G., Cattley, R. C. and Foster, P. M.** Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 2000;**55**, 143-151

*N*

---

**Nagy, L. and Schwabe, J. W.** Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 2004;**29**, 317-324

**Nair, N. and Kurup, C. K.** Effect of administration of diethylhexyl phthalate on the function and turnover of rat hepatic mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1987;**925**, 332-340

**Niemi, M., Ikonen, M. and Hervonen, A.** Histochemistry and fine structure of the interstitial tissue in the human foetal testis. 1967, London, Churchill

**Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. and Gustafsson, J. A.** Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;**81**, 1535-1565

**Noda, M., Ohno, S. and Nakajin, S.** Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces nuclear receptor 4A subfamily in NCI-H295R cells: a possible mechanism of aromatase suppression by MEHP. *Mol Cell Endocrinol* 2007;**274**, 8-18

**Nordberg, M., Jin, T. and Nordberg, G. F.** Cadmium, metallothionein and renal tubular toxicity. *IARC Sci Publ* 1992, 293-297

**NRNC** A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999;**97**, 161-163

**Nusse, R.** Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 2003;**130**, 5297-5305

*O*

---

**O'Connor, J. C., Frame, S. R. and Ladics, G. S.** Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. *Toxicol Sci* 2002;**69**, 79-91

**O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J. and Johnston, H.** The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 2006;**29**, 90-95; discussion 105-108

**O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., Monteiro, A., Cassie, S., Bhattacharya, S. and Fowler, P. A.** Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**, 4792-4801

**O'Shaughnessy, P. J. and Fowler, P. A.** Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 2011;**141**, 37-46

**Ohno, S., Yukinawa, F., Noda, M. and Nakajin, S.** Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces NR4A subfamily and GIOT-1 gene expression, and suppresses CYP19 expression in human granulosa-like tumor cell line KGN. *Toxicol Lett* 2009;**191**, 353-359

**Oishi, S. and Hiraga, K.** Effects of monoesters of O-phthalic acid on serum lipid composition of rats. *Toxicol Lett* 1982;**14**, 79-84

**Olaso, R. and Habert, R.** Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *J Androl* 2000;**21**, 497-511

**Olaso, R., Pairault, C., Boulogne, B., Durand, P. and Habert, R.** Transforming growth factor beta1 and beta2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology* 1998;**139**, 733-740

**Omezzine, A., Chater, S., Mauduit, C., Florin, A., Tabone, E., Chuzel, F., Bars, R. and Benahmed, M.** 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* 2003;**144**, 648-661

**Orth, J. M., Gunsalus, G. L. and Lamperti, A. A.** Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;**122**, 787-794

**Ostrer, H., Huang, H. Y., Masch, R. J. and Shapiro, E.** A cellular study of human testis development. *Sex Dev* 2007;**1**, 286-292

*P*

---

**Page, B. D. and Lacroix, G. M.** 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* 1995;**12**, 129-151

**Palmer, J. R., Hatch, E. E., Rao, R. S., Kaufman, R. H., Herbst, A. L., Noller, K. L., Titus-Ernstoff, L. and Hoover, R. N.** Infertility among women exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Am J Epidemiol* 2001;**154**, 316-321

**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. and Hoover, R. N.** Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ Health* 2009;**8**, 37

**Palmer, J. R., Wise, L. A., Robboy, S. J., Titus-Ernstoff, L., Noller, K. L., Herbst, A. L., Troisi, R. and Hoover, R. N.** Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Epidemiology* 2005;**16**, 583-586

**Palmer, M. S., Sinclair, A. H., Berta, P., Ellis, N. A., Goodfellow, P. N., Abbas, N. E. and Fellous, M.** Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 1989;**342**, 937-939

**Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P.** Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;**94**, 153-156

**Parks, L. G., Ostby, J. S., Lambright, C. R., Abbott, B. D., Klinefelter, G. R., Barlow, N. J. and Gray, L. E., Jr.** The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 2000;**58**, 339-349

**Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A. and Camerino, G.** R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006;**38**, 1304-1309

**Paulozzi, L. J., Erickson, J. D. and Jackson, R. J.** Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 1997;**100**, 831-834

**Pauls, K., Jager, R., Weber, S., Wardelmann, E., Koch, A., Buttner, R. and Schorle, H.** Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int J Cancer* 2005;**115**, 470-477

**Pauls, K., Schorle, H., Jeske, W., Brehm, R., Steger, K., Wernert, N., Buttner, R. and Zhou, H.** Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 2006;**21**, 397-404

**Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E. and Mangelsdorf, D. J.** Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;**93**, 693-704

**Pelletier, G. and El-Alfy, M.** Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**, 4835-4840

**Pellikainen, J. M. and Kosma, V. M.** Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. *Int J Cancer* 2007;**120**, 2061-2067

**Pelliniemi, L. J. and Niemi, M.** Fine structure of the human foetal testis. I. The interstitial tissue. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1969;**99**, 507-522

**Pereda, J., Zorn, T. and Soto-Suazo, M.** Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc Res Tech* 2006;**69**, 386-395

**Peters, J. M., Cheung, C. and Gonzalez, F. J.** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med* 2005;**83**, 774-785

**Petersen, C. and Soder, O.** The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 2006;**66**, 153-161

**Petersen, J. H. and Breindahl, T.** Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam* 2000;**17**, 133-141

**Picon, R.** Testosterone secretion by foetal rat testes in vitro. *J Endocrinol* 1976;**71**, 231-238

**Pierik, F. H., Burdorf, A., Nijman, J. M., de Muinck Keizer-Schrama, S. M., Juttman, R. E. and Weber, R. F.** A high hypospadias rate in The Netherlands. *Hum Reprod* 2002;**17**, 1112-1115

**Piprek, R. P.** Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol* 2010;**54**, 779-786

**Piquet-Pellorce, C., Dorval-Coiffec, I., Pham, M. D. and Jegou, B.** Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis. *Endocrinology* 2000;**141**, 1136-1141

**Pratt, W. B. and Toft, D. O.** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997;**18**, 306-360

**Prince, F. P.** The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol* 2001;**168**, 213-216

**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. et al.** 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* 2004;**101**, 11689-11694

R

---

**Rabinovici, J. and Jaffe, R. B.** Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev* 1990;**11**, 532-557

**Rajpert-De Meyts, E.** Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 2006;**12**, 303-323

**Rajpert-De Meyts, E., Hanstein, R., Jorgensen, N., Graem, N., Vogt, P. H. and Skakkebaek, N. E.** Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod* 2004;**19**, 1338-1344

**Rajpert-de Meyts, E. and Høei-Hansen, C. E.** From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci* 2007;**1120**, 168-180

**Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Brondum-Nielsen, K., Muller, J. and Skakkebaek, N. E.** Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS* 1998;**106**, 198-204; discussion 204-196

**Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Graem, N., Muller, J., Cate, R. L. and Skakkebaek, N. E.** Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**, 3836-3844

**Rajpert-De Meyts, E. and Skakkebaek, N. E.** Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 1994;**17**, 85-92

**Ramayya, M. S., Zhou, J., Kino, T., Segars, J. H., Bondy, C. A. and Chrousos, G. P.** Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**, 1799-1806

**Rasoulpour, R. J. and Boekelheide, K.** NF-kappaB is activated in the rat testis following exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2005;**72**, 479-486

**Raymond, C. S., Murphy, M. W., O'Sullivan, M. G., Bardwell, V. J. and Zarkower, D.** Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 2000;**14**, 2587-2595

**Reardon, W., Gibbons, R. J., Winter, R. M. and Baraitser, M.** Male pseudohermaphroditism in sibs with the alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome. *Am J Med Genet* 1995;**55**, 285-287

**Reddy, J. K., Moody, D. E., Azarnoff, D. L. and Rao, M. S.** Di-(2-ethylhexyl)phthalate: an industrial plasticizer induces hypolipidemia and enhances hepatic catalase and carnitine acetyltransferase activities in rat and mice. *Life Sci* 1976;**18**, 941-945

**Regadera, J., Martinez-Garcia, F., Gonzalez-Peramato, P., Serrano, A., Nistal, M. and Suarez-Quian, C.** Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**, 413-421

**Reinsberg, J., Wegener-Topper, P., van der Ven, K., van der Ven, H. and Klingmueller, D.** Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;**239**, 116-123

**Ren, H., Aleksunes, L. M., Wood, C., Vallanat, B., George, M. H., Klaassen, C. D. and Corton, J. C.** 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* 2010;**113**, 45-59

**Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Mangelsdorf, D. J.** Regulation of mouse sterol

regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000;**14**, 2819-2830

**Rey, R. A., Campo, S. M., Bedecarras, P., Nagle, C. A. and Chemes, H. E.** Is infancy a quiescent period of testicular development? Histological, morphometric, and functional study of the seminiferous tubules of the cebus monkey from birth to the end of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**76**, 1325-1331

**Reyes, F., Winter, J. and Faiman, C.** Endocrinology of the fetal testis. *The testis* 1989, Burger, H. et de Kretser, D. New York, Raven Press. 1: 119-142

**Reyes, F. I., Winter, J. S. and Faiman, C.** Studies on human sexual development. I. Fetal gonadal and adrenal sex steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;**37**, 74-78

**Richburg, J. H., Nanez, A., Williams, L. R., Embree, M. E. and Boekelheide, K.** Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology* 2000;**141**, 787-793

**Rider, C. V., Furr, J. R., Wilson, V. S. and Gray, L. E., Jr.** Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl* 2010;**33**, 443-462

**Robinson, L. L., Townsend, J. and Anderson, R. A.** The human fetal testis is a site of expression of neurotrophins and their receptors: regulation of the germ cell and peritubular cell population. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**, 3943-3951

**Rodriguez, E., Mathew, S., Mukherjee, A. B., Reuter, V. E., Bosl, G. J. and Chaganti, R. S.** Analysis of chromosome 12 aneuploidy in interphase cells from human male germ cell tumors by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;**5**, 21-29

**Rogers, R., Ouellet, G., Brown, C., Moyer, B., Rasoulpour, T. and Hixon, M.** Cross-talk between the Akt and NF-kappaB signaling pathways inhibits MEHP-induced germ cell apoptosis. *Toxicol Sci* 2008;**106**, 497-508

**Rosenfeld, M. G., Lunyak, V. V. and Glass, C. K.** Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 2006;**20**, 1405-1428

**Ross, A. J. and Capel, B.** Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab* 2005;**16**, 19-25

**Roulet, V., Satie, A. P., Ruffault, A., Le Tortorec, A., Denis, H., Guist'hau, O., Patard, J. J., Rioux-Leclerq, N., Gicquel, J., Jegou, B. et al.** Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro. *Am J Pathol* 2006;**169**, 2094-2103

**Rusyn, I., Peters, J. M. and Cunningham, M. L.** Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol* 2006;**36**, 459-479

Ryu, J. Y., Lee, E., Kim, T. H., Lee, Y. J., Lee, J., Lee, B. M., Kwack, S. J., Jung, K. K., Han, S. Y., Kim, S. H. *et al.* Time-response effects of testicular gene expression profiles in Sprague-Dawley male rats treated with di(n-butyl) phthalate. *J Toxicol Environ Health A* 2008;**71**, 1542-1549

S

---

Sadeghian, H., Anand-Ivell, R., Balvers, M., Relan, V. and Ivell, R. Constitutive regulation of the *Insl3* gene in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**241**, 10-20

Saez, J. M. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994;**15**, 574-626

Saillenfait, A. M., Roudot, A. C., Gallissot, F., Sabate, J. P. and Chagnon, M. C. Developmental toxic potential of di-n-propyl phthalate administered orally to rats. *J Appl Toxicol* 2011;**31**, 36-44

Saillenfait, A. M., Sabate, J. P. and Gallissot, F. Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol* 2009;**28**, 468-476

Salas-Cortes, L., Jaubert, F., Barbaux, S., Nessmann, C., Bono, M. R., Fellous, M., McElreavey, K. and Roseblatt, M. The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol* 1999;**43**, 135-140

Saunders, P. T., Millar, M. R., Macpherson, S., Irvine, D. S., Groome, N. P., Evans, L. R., Sharpe, R. M. and Scobie, G. A. ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbeta2/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**, 2706-2715

Scarano, W. R., Toledo, F. C., Guerra, M. T., Pinheiro, P. F., Domeniconi, R. F., Felisbino, S. L., Campos, S. G., Taboga, S. R. and Kempinas, W. G. 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* 2010;**73**, 972-984

Schacht, V., Dadras, S. S., Johnson, L. A., Jackson, D. G., Hong, Y. K. and Detmar, M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005;**166**, 913-921

Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D. and Diaz, J. J. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* 2002;**13**, 4100-4109

Schultz, R., Yan, W., Toppari, J., Volkl, A., Gustafsson, J. A. and Peltto-Huikko, M. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha messenger ribonucleic acid and protein in human and rat testis. *Endocrinology* 1999;**140**, 2968-2975

**Scott, H. M., Hutchison, G. R., Mahood, I. K., Hallmark, N., Welsh, M., De Gendt, K., Verhoeven, G., O'Shaughnessy, P. and Sharpe, R. M.** Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology* 2007;**148**, 2027-2036

**Scott, H. M., Mason, J. I. and Sharpe, R. M.** Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 2009;**30**, 883-925

**Sekido, R., Bar, I., Narvaez, V., Penny, G. and Lovell-Badge, R.** SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 2004;**274**, 271-279

**Sekido, R. and Lovell-Badge, R.** Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 2008;**453**, 930-934

**Shapiro, E., Huang, H., Masch, R. J., McFadden, D. E., Wilson, E. L. and Wu, X. R.** Immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in human fetal prostate. *J Urol* 2005;**174**, 2051-2053

**Sharpe, R. M.** Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 2001;**120**, 221-232

**Sharpe, R. M.** The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? *Int J Androl* 2003;**26**, 2-15

**Sharpe, R. M.** Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;**20**, 91-110

**Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C. and Fisher, J. S.** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;**125**, 769-784

**Sharpe, R. M. and Skakkebaek, N. E.** Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993;**341**, 1392-1395

**Sharpe, R. M., Turner, K. J., McKinnell, C., Groome, N. P., Atanassova, N., Millar, M. R., Buchanan, D. L. and Cooke, P. S.** Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *J Androl* 1999;**20**, 94-101

**Shono, T., Kai, H., Suita, S. and Nawata, H.** Time-specific effects of mono-n-butyl phthalate on the transabdominal descent of the testis in rat fetuses. *BJU Int* 2000;**86**, 121-125

**Shono, T., Shima, Y., Kondo, T. and Suita, S.** 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* 2005;**40**, 1861-1864

**Short, R. D., Robinson, E. C., Lington, A. W. and Chin, A. E.** Metabolic and peroxisome proliferation studies with di(2-ethylhexyl)phthalate in rats and monkeys. *Toxicol Ind Health* 1987;**3**, 185-195

**Shultz, V. D., Phillips, S., Sar, M., Foster, P. M. and Gaido, K. W.** Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2001;**64**, 233-242

**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. and Brock, J. W.** Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol* 2003;**77**, 561-567

**Silva, M. J., Reidy, J. A., Herbert, A. R., Preau, J. L., Jr., Needham, L. L. and Calafat, A. M.** Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004a;**72**, 1226-1231

**Silva, M. J., Slakman, A. R., Reidy, J. A., Preau, J. L., Jr., Herbert, A. R., Samandar, E., Needham, L. L. and Calafat, A. M.** Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004b;**805**, 161-167

**Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W. and Liao, J. K.** Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000;**407**, 538-541

**Skakkebaek, N. E.** Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 1972;**2**, 516-517

**Skakkebaek, N. E., Berthelsen, J. G., Giwercman, A. and Muller, J.** Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 1987;**10**, 19-28

**Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K. M.** Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;**16**, 972-978

**Sluka, P., O'Donnell, L., McLachlan, R. I. and Stanton, P. G.** Application of laser-capture microdissection to analysis of gene expression in the testis. *Prog Histochem Cytochem* 2008;**42**, 173-201

**Smith-Oliver, T. and Butterworth, B. E.** Correlation of the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) with induced hyperplasia rather than with genotoxic activity. *Mutat Res* 1987;**188**, 21-28

**Snider, W. D.** Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994;**77**, 627-638

**Sobarzo, C. M., Lustig, L., Ponzio, R., Suescun, M. O. and Denduchis, B.** Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on gap and tight junction protein expression in the testis of prepubertal rats. *Microsc Res Tech* 2009;**72**, 868-877

**Sonne, S. B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A. S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N. J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P. E. et al.** Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* 2009;**69**, 5241-5250

**Sonne, S. B., Herlihy, A. S., Hoei-Hansen, C. E., Nielsen, J. E., Almstrup, K., Skakkebaek, N. E., Marks, A., Leffers, H. and Rajpert-De Meyts, E.** Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. *Virchows Arch* 2006;**449**, 200-206

**Sonoda, J., Pei, L. and Evans, R. M.** Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 2008;**582**, 2-9

**Stahlhut, R. W., van Wijngaarden, E., Dye, T. D., Cook, S. and Swan, S. H.** Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 2007;**115**, 876-882

**Steger, K., Rey, R., Kliesch, S., Louis, F., Schleicher, G. and Bergmann, M.** Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl* 1996;**19**, 122-128

**Stroheker, T., Regnier, J. F., Lassarguere, J. and Chagnon, M. C.** Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006;**44**, 2064-2069

**Struve, M. F., Gaido, K. W., Hensley, J. B., Lehmann, K. P., Ross, S. M., Sochaski, M. A., Willson, G. A. and Dorman, D. C.** Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2009;**86**, 345-354

**Suarez-Quian, C. A., Martinez-Garcia, F., Nistal, M. and Regadera, J.** Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**, 350-358

**Svechnikov, K., Svechnikova, I. and Soder, O.** Inhibitory effects of mono-ethylhexyl phthalate on steroidogenesis in immature and adult rat Leydig cells in vitro. *Reprod Toxicol* 2008;**25**, 485-490

**Svechnikova, I., Svechnikov, K. and Soder, O.** The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol* 2007;**194**, 603-609

**Swan, S. H., Elkin, E. P. and Fenster, L.** The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 2000;**108**, 961-966

**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. et al.** Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;**113**, 1056-1061

T

---

**Takeuchi, S., Iida, M., Kobayashi, S., Jin, K., Matsuda, T. and Kojima, H.** Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology* 2005;**210**, 223-233

**Takeyama, J., Suzuki, T., Inoue, S., Kaneko, C., Nagura, H., Harada, N. and Sasano, H.** Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**, 2258-2262

**Tanaka, A., Adachi, T., Takahashi, T. and Yamaha, T.** Biochemical studies on phthalic esters I. Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* 1975;**4**, 253-264

**Tapanainen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P., Pelliniemi, L. and Huhtaniemi, I.** Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;**52**, 98-102

**Thompson, C. J., Ross, S. M. and Gaido, K. W.** Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinology* 2004;**145**, 1227-1237

**Tilmann, C. and Capel, B.** Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 1999;**126**, 2883-2890

**Tomita, I., Nakamura, Y., Yagi, Y. and Tutikawa, K.** Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ Health Perspect* 1986;**65**, 249-254

**Toppari, J., Kaleva, M. and Virtanen, H. E.** Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;**7**, 282-286

**Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jr., Jegou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N. et al.** Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;**104 Suppl 4**, 741-803

**Tran, D., Picard, J. Y., Campargue, J. and Josso, N.** Immunocytochemical detection of anti-mullerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. *J Histochem Cytochem* 1987;**35**, 733-743

**Treinen, K. A., Dodson, W. C. and Heindel, J. J.** Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;**106**, 334-340

**Tremblay, J. J. and Robert, N. M.** Role of nuclear receptors in INSL3 gene transcription in Leydig cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005;**1061**, 183-189

**Tu, J., Fan, L., Tao, K., Zhu, W., Li, J. and Lu, G.** Stem cell factor affects fate determination of human gonocytes in vitro. *Reproduction* 2007;**134**, 757-765

**Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Fail, P. A., Seely, J. C., Brine, D. R., Barter, R. A. and Butala, J. H.** Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol* 2004;**18**, 241-264

## U

---

**Ubios, A. M., Guglielmotti, M. B., Steimetz, T. and Cabrini, R. L.** Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 1991;**54**, 17-23

**Ubios, A. M., Piloni, M. J., Marzorati, M. and Cabrini, R. L.** Bone growth is impaired by uranium intoxication. *Acta Odontol Latinoam* 1994;**8**, 3-8

**Umehara, F., Tate, G., Itoh, K., Yamaguchi, N., Douchi, T., Mitsuya, T. and Osame, M.** A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* 2000;**67**, 1302-1305

## V

---

**Vale, W., Rivier, C., Hsueh, A., Campen, C., Meunier, H., Bicsak, T., Vaughan, J., Corrigan, A., Bardin, W., Sawchenko, P. et al.** Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 1988;**44**, 1-34

**Veitia, R. A.** FOXL2 versus SOX9: a lifelong "battle of the sexes". *Bioessays* 2010;**32**, 375-380

**Veitia, R. A., Salas-Cortes, L., Ottolenghi, C., Pailhoux, E., Cotinot, C. and Fellous, M.** Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 2001;**179**, 3-16

**Vierhapper, H., Nowotny, P. and Waldhausl, W.** Reduced production rates of testosterone and dihydrotestosterone in healthy men treated with rosiglitazone. *Metabolism* 2003;**52**, 230-232

**Vogel, T. and Schmidtke, J.** Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet* 1998;**80**, 209-213

**Volle, D. H. and Lobaccaro, J. M.** Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 2007;**265-266**, 183-189

**Volle, D. H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Dechelotte, P., Sion, B., Veyssiere, G., Benahmed, M. and Lobaccaro, J. M.** Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007;**21**, 1014-1027

**von Eckardstein, S., Syska, A., Gromoll, J., Kamischke, A., Simoni, M. and Nieschlag, E.** Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**, 2585-2590

**von Leydig, F.** Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugethiere. *Zoologie* 1850;**2**, 1-57

**Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D.** Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 2000;**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. et al.** Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994;**79**, 1111-1120

**Ward, J. M., Peters, J. M., Perella, C. M. and Gonzalez, F. J.** Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol* 1998;**26**, 240-246

**Wartenberg, H.** Comparative cytomorphic aspects of the male germ cells, especially of the "Gonia". *Andrologia* 1976;**8**, 117-130

**Wartenberg, H.** Differentiation and development of the testes. 1989;New York, Raven Press.

**Waxman, D. J.** P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999;**369**, 11-23

**Weidner, I. S., Moller, H., Jensen, T. K. and Skakkebaek, N. E.** Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 1998;**106**, 793-796

**Welsh, M., Saunders, P. T., Finken, M., Scott, H. M., Hutchison, G. R., Smith, L. B. and Sharpe, R. M.** Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 2008;**118**, 1479-1490

**Wermann, H., Stoop, H., Gillis, A. J., Honecker, F., van Gurp, R. J., Ammerpohl, O., Richter, J., Oosterhuis, J. W., Bokemeyer, C. and Looijenga, L. H.** Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J Pathol* 2010;**221**, 433-442

**White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P. and Parker, M. G.** Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994;**135**, 175-182

**Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M. J., Combes, A. N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H. and Koopman, P.** Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 2005;**287**, 111-124

**Wilhelm, D., Palmer, S. and Koopman, P.** Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 2007;**87**, 1-28

**Wilson, V. S., Howdeshell, K. L., Lambright, C. S., Furr, J. and Earl Gray, L., Jr.** Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague-Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure. *Toxicol Lett* 2007;**170**, 177-184

**Wittassek, M. and Angerer, J.** Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl* 2008;**31**, 131-138

**Wittassek, M., Wiesmuller, G. A., Koch, H. M., Eckard, R., Dobler, L., Muller, J., Angerer, J. and Schluter, C.** Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* 2007;**210**, 319-333

**Wohlfahrt-Veje, C., Main, K. M. and Skakkebaek, N. E.** Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;**71**, 459-465

**Wood, H. M. and Elder, J. S.** Cryptorchidism and testicular cancer: separating fact from fiction. *J Urol* 2009;**181**, 452-461

**Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M. and Hungerbuhler, K.** What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal* 2006;**26**, 803-824

X

---

**Xiao-feng, Z., Nai-qiang, Q., Jing, Z., Zi, L. and Yang, Z.** Di (n-butyl) phthalate inhibits testosterone synthesis through a glucocorticoid-mediated pathway in rats. *Int J Toxicol* 2009;**28**, 448-456

**Xie, W., Radomska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C. M., Nelson, M. C., Ong, E. S., Waxman, D. J. and Evans, R. M.** An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**, 3375-3380

**Xie, Y., Yang, Q. and DePierre, J. W.** 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* 2002;**973**, 17-25

## Y

---

**Yamamoto, K., Tojo, A., Aoki, N. and Shibuya, M.** Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* 1993;**84**, 1136-1144

**Yao, P. L., Lin, Y. C. and Richburg, J. H.** TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol Reprod* 2009;**80**, 581-589

**Yao, P. L., Lin, Y. C. and Richburg, J. H.** Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod* 2010;**82**, 516-527

**Yao, P. L., Lin, Y. C., Sawhney, P. and Richburg, J. H.** Transcriptional regulation of FasL expression and participation of sTNF-alpha in response to sertoli cell injury. *J Biol Chem* 2007;**282**, 5420-5431

## Z

---

**Zamora, M. L., Tracy, B. L., Zielinski, J. M., Meyerhof, D. P. and Moss, M. A.** Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 1998;**43**, 68-77

**Zenzes, M. T., Krishnan, S., Krishnan, B., Zhang, H. and Casper, R. F.** Cadmium accumulation in follicular fluid of women in in vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil Steril* 1995;**64**, 599-603

**Zhang, Z., Burch, P. E., Cooney, A. J., Lanz, R. B., Pereira, F. A., Wu, J., Gibbs, R. A., Weinstock, G. and Wheeler, D. A.** Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res* 2004;**14**, 580-590

**Zhu, X. B., Tay, T. W., Andriana, B. B., Alam, M. S., Choi, E. K., Tsunekawa, N., Kanai, Y. and Kurohmaru, M.** Effects of di-iso-butyl phthalate on testes of prepubertal rats and mice. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2010;**86**, 129-136



---

# ANNEXES

---



CADMIUM INCREASES HUMAN FETAL GERM CELL APOPTOSIS

Gaëlle Angenard\*, Vincent Muczynski\*, Hervé Coffigny, Catherine Pairault, Clotilde Duquenne,  
René Frydman, René Habert, Virginie Rouiller-Fabre\* et Gabriel Livera\*

Parmi les différents polluants de notre environnement, les métaux lourds sont des composés largement représentés très généralement issus des rejets de l'activité humaine. Ces composés peuvent être facilement absorbés, par inhalation ou par ingestion, et ainsi représenter un danger pour la santé. Dans le contexte de l'augmentation des anomalies de la fonction de reproduction masculine et des effets potentiels de l'environnement, il nous a paru essentiel de nous intéresser à l'impact des métaux lourds sur le développement de la lignée germinale fœtale humaine.

Parmi ces éléments, le Cadmium (Cd) se trouve être largement répandu dans l'environnement, principalement en raison des rejets industriels ou d'activités agricoles, ainsi que de la combustion des énergies fossiles (Nordberg *et al.*, 1992; Martelli *et al.*, 2006). Le Cd est aussi très fortement présent dans la fumée de cigarette, qui constitue à l'heure actuelle, une des sources d'exposition majeure (Zenzes *et al.*, 1995). L'effet de ce métal lourd, connu dans différents modèles pour altérer la fonction de reproduction adulte, à la fois mâle et femelle, a été très peu étudié au cours de la vie fœtale. Seule une étude réalisée chez la souris a montré que l'exposition *in utero* entraîne une anomalie de développement des gonades mâles et femelles chez la descendance. En revanche, au moment où nous avons amorcé ce travail, aucune donnée n'étaient disponibles chez l'Homme.

Dans cet article, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'exposition *in vitro* au Cd, dans notre modèle de culture organotypique, à la fois sur la gonade fœtale humaine et la gonade fœtale murine.

En ce qui concerne les gonades fœtales humaines, prélevées durant le premier trimestre de la gestation, nous avons montré ici que l'exposition au Cd provoque une diminution du nombre total de cellules germinales fœtales, chez le mâle comme chez la femelle, dès la dose de 1µM. Cette diminution se traduit par une augmentation de l'apoptose de ces cellules sans modification de leur index de prolifération. Par ailleurs, nous avons analysé l'apoptose de ces cellules germinales après exposition à des doses croissantes de Cd

et nous avons mis en évidence que ce composé exerce un effet délétère dose dépendant sur les cellules germinales de l'ovaire et du testicule fœtal humain. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons également analysé l'impact de l'exposition au Cd sur le développement des gonades mâles et femelles murines prélevées à 12,5 jpc, c'est à dire au moment de la mise en place des fonctions gonadiques. Pour l'ovaire fœtal murin, l'exposition *in vitro* au Cd à la même dose que chez l'Homme (1 $\mu$ M) entraîne également une diminution du nombre de cellules germinales fœtales, corrélée par une augmentation de l'apoptose de ces cellules. En revanche chez le mâle cette diminution du nombre de cellules germinales n'est pas retrouvée. Ceci montre une sensibilité accrue du testicule fœtal humain par rapport au testicule murin.

Cette étude a donc apporté la démonstration expérimentale de la toxicité du Cadmium sur le développement de la lignée germinale fœtale humaine, à la fois chez le mâle et chez la femelle. Au premier trimestre de la gestation, nous avons montré que la gonade est un organe très sensible puisque les effets délétères du Cd sont observables pour des doses largement inférieures aux données de la littérature relatives aux effets de ce composé sur d'autres organes. En effet, l'action délétère du Cd est majoritairement décrite à des concentrations supérieures à 100 $\mu$ M (Lasfer *et al.*, 2008; Gulisano *et al.*, 2009). Ces résultats mettent en exergue la sensibilité au Cd des gonades fœtales humaines (mâle ou femelle) et plus particulièrement de la lignée germinale, au cours de la grossesse. L'exposition potentielle, à ce type de composé, pendant la période fœtale, ainsi que les risques encourus par le fœtus, représentent donc un réel enjeu de santé publique.



*IN VITRO* EFFECTS OF URANIUM ON HUMAN FETAL GERM CELLS

*Gaëlle Angenard, Vincent Muczynski, Hervé Coffigny, Clotilde Duquenne, René Frydman, René Habert, Gabriel Livera\* et Virginie Rouiller-Fabre\**

Dans la continuité de l'article précédent, nous avons pu, grâce aux infrastructures du CEA, réaliser une étude similaire décrivant l'impact de l'uranium sur le développement de la gonade fœtale humaine. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet de toxicologie nucléaire financé par le CEA.

L'uranium naturel fait parti, tout comme le Cd, des métaux dit « métaux lourds ». Les résidus d'extraction minière sont responsables de la contamination des sols et des eaux dans certaines régions, ce qui représente la source d'exposition la plus fréquente dans notre environnement. L'uranium est connu pour engendrer chez l'Homme un dysfonctionnement du système rénal ainsi qu'une anomalie du développement osseux (Ubios *et al.*, 1991; Ubios *et al.*, 1994; Zamora *et al.*, 1998; McDiarmid *et al.*, 2001). En revanche, très peu de travaux se sont penchés sur l'effet de ce composé sur le développement de la fonction de reproduction. Une étude a toutefois analysé les conséquences d'une contamination de souris gestantes par l'eau de boisson sur la descendance femelle. Ces travaux ont non seulement montré que l'uranium affecte le nombre de follicules primaires chez les nouveaux-nés, mais surtout que ce composé est à même de traverser la barrière foeto-placentaire au cours de la gestation. Ces données soulèvent les risques potentiels de l'exposition à ce composé au cours de la grossesse, pour les fonctions de reproduction du fœtus.

En utilisant le modèle de culture organotypique de gonade humaine, nous avons analysé l'effet toxique de l'acétate d'uranyle sur le développement de la lignée germinale dans l'ovaire et le testicule fœtal. Ces analyses ont été réalisées en parallèle chez l'Homme au premier trimestre de la gestation et à 12,5 jpc chez la souris afin de pouvoir comparer les différences de sensibilité inter-espèce. L'analyse histologique après traitement nous a permis de mettre en évidence une grande sensibilité de la gonade humaine par rapport à la gonade murine. En effet, pour une dose d'uranium élevée (1µM), le testicule comme l'ovaire humain présentent de larges zones de nécrose alors que la gonade murine est beaucoup moins affectée. L'exposition à des doses croissantes d'uranium a montré, chez l'Homme, une

induction de l'apoptose des cellules germinales mâles et femelles de manière dose dépendante. Cette élévation du taux d'apoptose se traduit par une diminution du nombre de cellules germinales fœtales, encore une fois dans les deux sexes. Ces effets délétères de l'uranium sont observables dès l'exposition à une dose de 0,05 $\mu$ M chez l'Homme, alors qu'une dose plus élevée est requise chez la souris pour induire des effets similaires.

Nous avons donc démontré dans ces travaux, la grande sensibilité des cellules germinales du testicule et de l'ovaire fœtal humain vis à vis de l'exposition à l'uranium au premier trimestre de la grossesse. Ceci reflète, au même titre que pour le cadmium, le réel danger d'une exposition des populations humaines à l'uranium. De plus, la différence de sensibilité entre la souris et l'homme, souligne, pour ce type de travaux, l'importance fondamentale des études expérimentales réalisées directement sur le modèle humain.



## LISTE DES PUBLICATIONS :

---

Muczynski V, Cravedi J-P, Lehraiki A, Levacher C, Moison D, Lecureuil C, Messiaen S, Perdu E, Frydman R, Habert R and Rouiller-Fabre V. (2011) *The highest environmental exposure to Mono-(2-Ethyl Hexyl) Phthalate is sufficient to induce apoptosis of male fetal germ cells in human*. Biochimie (soumis)

Rouiller-Fabre V, Muczynski V, Lécureuil C, Livera G, Lambrot R, Moison D, Frydman R and Habert R. (2011) *Polluants environnementaux et troubles de la reproduction masculine: les phtalates au cœur du débat*. Cahiers de nutrition et de diététique, Société Française de Nutrition (Sous presse)

Habert R, Muczynski V, Lehraiki A, Moison D, Lambrot R, Levacher C, Lécureuil C, Frydman R and Rouiller-Fabre V. (2011) *Altérations environnementales du développement du testicule fœtal : zoom sur les phtalates*. Andrologie (sous presse)

Angenard G\*, Muczynski V\*, Coffigny H, Duquenne C, Frydman R, Habert R, Livera G and Rouiller-Fabre V. (2011) *In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells*. Reprod Toxicol (sous presse)

Angenard G\*, Muczynski V\*, Coffigny H, Pairault C, Duquenne C, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V and Livera G. (2010) *Cadmium increases human fetal germ cell apoptosis*. Environ Health Perspect 118 : 331-7

Rouiller-Fabre V, Muczynski V, Lambrot R, Lécureuil C, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Angenard G, Bakalska M, Courtot AM, Frydman R and Habert R. (2009) *Ontogenesis of testicular function in humans*. Folia Histochem Cyto 47 : S19-24

Habert R, Muczynski V, Lehraiki A, Lambrot R, Lécureuil C, Levacher C, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R and Rouiller-Fabre V. (2009) *Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates*. Folia Histochem Cytol 7 : S67-74

Lambrot R\*, Muczynski V\*, Lécureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R and 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 : 32-37

Rouiller-Fabre V, Lambrot R, Muczynski V, Coffigny H, Lécureuil C, Pairault C, Bakalska M, Courtot AM, Frydman R, and Habert R. (2008) *Development and regulations of testicular functions in the human fetus*. Gynecol Obstet Fertil 36 : 898-907

Habert R, Lécureuil C, Muczynski V, Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, Courtot AM, Frydman R and Rouiller-Fabre V. (2008) *Les cellules germinales au sein du testicule fœtal humain*. Médecine de la Reproduction, Gynécologie, Endocrinologie 10 : 360-2